

TARCILA BUENO DOS SANTOS

**ESTUDO CINÉTICO DA OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÁCIDO
5-O-CAFEOILQUÍNICO POR POLIFENOLOXIDASES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química– PPGEQ – Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Everton Fernando Zanoelo

Coorientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas bênçãos, proteção, por seu Filho amado Jesus.

Ao professor Everton Fernando Zanoelo, pela dedicação, zelo ao trabalho, apoio e orientação.

Ao professor David Alexander Mitchell pela orientação e amizade.

À professora Nádia Krieger e toda a equipe de seu laboratório. Agradeço imensamente pela atenção, paciência, pelo espaço usufruído, pelos equipamentos e reagentes que gentilmente me foram cedidos.

Ao professor Luiz Augusto da Cruz Meleiro, que considero um grande amigo no meio acadêmico.

Aos professores do PPGEQ: Alexandre Knesebeck , Carlos Itsuo Yamamoto, David Alexander Mitchell, Everton Fernando Zanoelo, Luiz Augusto da Cruz Meleiro, Luiz Fernando de Lima Luz Júnior, Marcelo Kaminski Lenzi, Papa Matar Ndiaye pelo ensino recebido durante estes dois anos.

À mestranda Vivian Moure pelo tempo dispensado, pela ajuda na execução deste estudo, pelo aprendizado compartilhado nos trabalhos com a tirosinase, por todo o conhecimento recebido e principalmente pela sincera amizade.

As minhas amigas de mestrado Karine Scroccaro e Viridiane Vianna, pelo companheirismo, amizade e parceria durante estes dois anos.

Aos meus pais e meu irmão, que sempre torceram e oraram por mim.

Ao meu esposo Pedro, pelo carinho e apoio que me foi dado.

Aos meus amigos da Igreja Batista Maranata, agradeço pelo carinho, pelas orações e pelas palavras de apoio.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

RESUMO

Ensaio experimentais foram realizados para estudo da oxidação do ácido 5-*o*-cafeoilquínico (5-CQA) na presença das enzimas polifenoloxidasas (PPO). Em particular, os efeitos da concentração de substrato e temperatura foram investigados no intervalo de aproximadamente 0,04 a 1,5 mM e 18 a 40 °C, respectivamente. Todos os dados cinéticos foram obtidos em reator batelada de vidro operando isotermicamente e em pH ótimo de atividade enzimática, o qual foi previamente determinado com tampão *citrato-fosfato*. Medidas *on-line* de absorbância foram realizadas com espectrofotômetro para obtenção de dados de concentração de 5-CQA em função dos fatores investigados. Os resultados experimentais foram utilizados para determinação dos parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten e para o cálculo do efeito da temperatura sobre a velocidade máxima de oxidação do 5-CQA através da expressão de Arrhenius. O modelo cinético simplificado sugerido, representado por uma expressão algébrica em função de duas variáveis (*t* e *T*), reproduz o consumo de 5-CQA em todas as condições cinéticas investigadas. Simulações em condições de tempo e temperatura próximas às encontradas durante a estocagem de erva-mate indicam altos níveis de oxidação de 5-CQA por ação enzimática.

ABSTRACT

A set of experiments to investigate the enzymatic oxidation of the 5-*o*-caffeoylquinic acid (5-CQA) with polyphenoloxidases was carried out. In particular, the effects of substrate concentration and temperature on reaction rates were examined in the range of 0.04 to 1.5 mM and 18 to 40 °C, respectively. All the kinetic data were obtained in a batch isothermal reactor made of quartz and operated at optimum pH for enzyme activity, which was previously determined with citrate-phosphate buffer. The experimental results were used to calculate the kinetic parameters of the Michaelis-Menten model and also to estimate the influence of temperature on the maximum velocity of 5-CQA oxidation by involving a typical Arrhenius equation. The suggested simplified kinetic model, represented by an algebraic expression as a function of two variables (t and T), reproduce the disappearance of 5-CQA in all the investigated kinetic conditions. Mathematical simulations have indicated high rates of 5-CQA oxidations in leaves of mate manufactured at conditions of time and temperature typically found in the mate industry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ácido 5- <i>o</i> -cafeoilquínico, 5-CQA. Fonte: PRIGENT, (2005).....	8
Figura 2.2 Estrutura da tirosinase (PPO) de <i>Streptomyces casteneoglobisporus</i> . Adaptado de MATOBA <i>et al.</i> , (2006) referenciado por MAYER, (2006).	10
Figura 2.3 - Atividades cresolase e catecolase da polifenoloxidase. Adaptado de MATHEIS and WHITAKER, (1984), referenciado por PRIGENT, (2005).....	11
Figura 2.4 - Processo de desnaturação enzimática. (a) Estrutura tri-dimensional nativa estabilizada por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas. (b) Estrutura desestabilizada pelas vibrações térmicas (pode ter atividade, às vezes maior que a nativa, se a estrutura for mais flexível). (c) Estrutura nativa tri-dimensional totalmente rompida (estrutura secundária mantida, mas provavelmente sem atividade). (d) Rolo aleatório. Fonte: MITCHELL, (2008)	15
Figura 4.1- Uma comparação da atividade enzimática relativa da PPO utilizada nesta investigação (símbolos) com resultados da literatura (linhas). Linha contínua: SÉLLES-MARCHART <i>et al.</i> , (2006); Linha tracejada: FARIA <i>et al.</i> , (2007).	32
Figura 4.2 - Efeito do pH sobre a absorbância de uma solução de 5-CQA (0,02 mg ml ⁻¹) na ausência de enzimas em tampão <i>citrato-fosfato</i>	33
Figura 4.3 - Relação entre a concentração de 5-CQA de soluções padrão e a absorbância a 325 nm.	34
Figura 4.1 - Relação entre a concentração de 5-CQA e a absorbância das <i>o</i> -Q para estimativa de $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$ da Equação (3.14).....	36
Figura 4.5 - Absorbância dos produtos a 400 nm a [5-CQA] ₀ = 0,045mM (ensaio S1 da Tabela 3.1). Linha contínua=Equação (4.1).	37

Figura 4.6 - Absorbância dos produtos a 400 nm a $[5\text{-CQA}]_0=0,706$ mM (ensaio S2 da Tabela 3.1). Linha contínua=Equação (4.1).	37
Figura 4.7 - Absorbância dos produtos a 400 nm a $[5\text{-CQA}]_0=1,411$ mM (ensaio S3 da Tabela 3.1). Linha contínua=Equação (4.1).	38
Figura 4.8 -Representação gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk (a); por Eadie-Hofstee (b), por Langmuir (c) e por regressão não-linear (d).	39
Figura 4.9 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curva) da velocidade de oxidação do 5-CQA em função de sua concentração inicial. Incerteza calculada considerando $K_M=0,137 \pm 0,071$ mM e $v_{\text{máx}}=1,875 \times 10^{-4} \pm 0,19 \times 10^{-4}$ mM.s ⁻¹ obtidos por diferentes procedimentos de linearização da Equação de Michaelis-Menten e por ajuste não linear.	40
Figura 4.10 - Equação linearizada de Arrhenius para análise do efeito da temperatura sobre a velocidade inicial em $S_0=0,045$ mM. $A'_{\text{o}}=1422$ mM s ⁻¹ , $E_a/R=5185$ e $E_a=43,1$ KJ/mol.	42
Figura 4.11 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curvas) da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação a $T=18^\circ\text{C}$ com $S_0=0,045$ mM.	43
Figura 4.12 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curvas) da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação à $T=25^\circ\text{C}$ com $S_0=0,045$ mM.	44
Figura 4.13 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curvas) da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação a $T=32^\circ\text{C}$ com $S_0=0,045$ mM.	45
Figura 4.14 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curvas) da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação a $T=39^\circ\text{C}$ com $S_0=0,045$ mM.	46
Figura 4.15 - Concentrações experimentais (símbolos) e calculadas (curvas) de 5-CQA em função do tempo de reação nas temperaturas de 20°C (a), 27°C (b), 32°C (c) e 39°C (d), e $S_0=0,169$ mM.	47

Figura 4.16- Concentrações experimentais (símbolos) e calculadas (curvas) de 5-CQA em função do tempo de reação nas temperaturas de 27 °C (a) e 39 °C (b) e $S_0=0,0564$ mM.... 48

Figura 4.17 - Perfis de concentração adimensional de 5-CQA na erva-mate estocada a $T=25$ °C e concentrações de substrato definidas pela Equação (4.3). 49

Figura 4.18 - Concentração adimensional de 5-CQA na erva-mate estocada a $T=25$ °C e concentrações de substrato iniciais iguais a 6,4 mM (a) e 69, 9 mM (b). 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1- Propriedades químicas e físicas do 5-CQA (PRIGENT, 2005).	8
Tabela 2. 2 - pH ótimo das polifenoloxidasas de diversos produtos.	11
Tabela 2.3 - K_M e condições experimentais cinéticas da oxidação do 5-CQA por PPO's....	19
Tabela 3. 1 - Condições experimentais para definição dos parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten e da equação de Arrhenius em pH=6,8 e $[E]_o=0,016\text{mg ml}^{-1}$	21
Tabela 3.2- Condições experimentais para obtenção de dados adicionais para validação do modelo de Michaelis-Menten.	27
Tabela 4.1 - Parâmetros do modelo de Michaelis-Menten ajustados de acordo com diferentes métodos.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHC	Ácido Hidroxiclorogênico
CGA	Ácidos Clorogênicos
CQA	Ácido Cafeoilquínico
5-CQA	Ácido 5- <i>o</i> -Cafeoilquínico
HPLC	Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HQ	Hidróxiquinona
<i>o</i> - <i>Q</i>	Orto-Quinona
PPO	Polifenoloxidase
POD	Peroxidase
TCA	Ácido Tricloroacético
b.u.	Base úmida
kDa	kilo Dalton

LISTA DE SÍMBOLOS

a, b	Constantes Definidas na Equação (4.1)
A_{5-CQA}	Absorbância do 5-CQA
A_{o-Q}	Absorbância de o-Q
A_o	Fator de Frequência Definido na Equação (2.5)
A'_o	Fator de Frequência Definido na Equação (3.2)
At	Atividade enzimática
At_{erva}	Atividade enzimática na erva-mate
At_r	Atividade enzimática residual
α	Constante Definida na Equação (3.2)
β	Coeficiente Estequiométrico de 5-CQA na Reação (3.5)
ε	Coeficiente de Absortividade Molar do 5-CQA
ε_{o-Q}	Coeficiente de Absortividade Molar da o-Q
E_a	Energia de Ativação
$[E]$	Concentração da Enzima
$[E]_o$	Concentração inicial da Enzima
γ	Coeficiente Estequiométrico de o-Q na reação (3.5)
k_{cat}	Constante de Especificidade
K_M	Constante de Michaelis-Menten
R	Constante Universal dos gases
$[S]$	Concentração de Substrato
$[S]_o$	Concentração Inicial de Substrato
ρ_{eM}	Densidade da erva-mate <i>in natura</i>
ρ_{eS}	Densidade da erva-mate seca
m	Massa
PM	Peso Molecular
t	Tempo de Reação
T	Temperatura

ξ	Grau de avanço da Reação
V	Volume
v_o	Velocidade Inicial de Reação
$v_{m\acute{a}x}$	Velocidade Máxima
V_e	Volume do Extrato
X_{5-CQA}	Fração Molar do 5-CQA

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Erva-Mate	3
2.1.1. Características da Planta e Importância Sócio-Econômica	3
2.1.2. Beneficiamento	4
2.2. Composição Química da Erva-Mate.....	6
2.2.1. Ácidos Clorogênicos	6
2.3. Enzimas Presentes na Erva-Mate	8
2.3.1. Polifenoloxidasas.....	9
2.3.2. Mecanismo de Reação da Tirosinase.....	12
2.4 Caracterização das Variáveis que Afetam a Cinética Enzimática.....	12
2.4.1. Substrato	12
2.4.2. Temperatura.....	14
2.4.3. pH	16
2.5. Mecanismo Enzimático de Oxidação do 5-CQA na Erva-Mate.....	17
2.6. Valores de K_M Disponíveis na Literatura para a Reação de Oxidação do 5-CQA	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Atividade Enzimática em Diferentes pH's	22
3.2. Experimentos para Ajuste dos Parâmetros do Modelo Cinético	24
3.2.1. Efeito da Concentração de Substrato.....	25
3.2.2. Efeito da Temperatura	25
3.3. Experimentos para Validação do Modelo Cinético.....	26

3.4. Tratamento de Dados.....	27
3.4.1. Relação entre as curvas de consumo de 5-CQA e de formação de <i>o</i> -Q.....	28
3.4.2. Ajuste dos parâmetros cinéticos e integração da expressão de Michaelis-Menten	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Atividade Enzimática em Diferentes pH's e Coeficiente de Absortividade Molar do 5-CQA	32
4.2. Determinação dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten	35
4.3. Determinação dos parâmetros da equação de Arrhenius.....	41
4.4 Validação do Modelo.....	42
4.5. Simulação da degradação do 5-CQA e do CGA total durante o armazenamento da erva-mate.	48
5. CONCLUSÃO.....	53
6. PERSPECTIVAS FUTURAS E SUGESTÕES	54
7. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos encontrados nas folhas de erva-mate tem como representantes majoritários os ácidos clorogênicos (CGA) (ROBERTS, 1956; RIVELLI *et al.*, 2007; CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; CLIFFORD, 1999). Os CGA são uma família de ésteres formados entre certos ácidos transcinâmicos e o ácido quínico. Dentre os aproximadamente 18 compostos (CLIFFORD *et al.*, 2003) identificados como pertencentes a este grupo, os monoésteres do ácido caféico (3,4,5-CQA) são as espécies mais abundantes na erva-mate. Em particular, a presente investigação é focada no ácido 5-*o*-cafeoilquínico (5-CQA), por ser este isômero disponível comercialmente e por estar presente em maiores concentrações na erva-mate.

Os CGA são compostos derivados do metabolismo secundário da planta. Estes compostos exercem papéis medicinais devido à sua atividade antioxidante (BASTOS, 2006; RIVELLI *et al.*, 2007; PRIGENT, 2005). Dietas ricas em espécies fenólicas têm sido associadas a inibições de certos neoplasmas e reduções de risco de desenvolvimento de doenças cardíacas em seres humanos (IARC, 1991; TANAKA e MORI, 1995). Apesar da importância medicinal, estudos qualitativos têm sugerido o fato de que substratos fenólicos como os CGA sofrem reações enzimáticas na presença de oxigênio. Estas reações podem ocorrer nas diferentes etapas de processamento de erva-mate, principalmente durante a estocagem, e podem reduzir as concentrações de CGA no produto *in natura*, assim como os efeitos benéficos do consumo de alimentos derivados da erva-mate. Apesar desta constatação, escassas investigações experimentais têm sido propostas no sentido de quantificar a velocidade de degradação dos CGA devido à atividade enzimática (MARTINEZ e DUVNJAK, 2006; SELLÉS-MARCHART *et al.*, 2006; NEVES e da SILVA, 2007; MUÑOZ *et al.*, 2007).

Neste contexto, a presente investigação tem como objetivo principal a determinação experimental de curvas cinéticas que reproduzam a variação de concentração do 5-CQA em diferentes condições de operação. Em particular, pretende-se investigar o efeito da temperatura e concentração de substrato sobre a velocidade de oxidação enzimática desta espécie. Os resultados experimentais serão utilizados para desenvolvimento de um modelo cinético que leve em consideração a influência dos fatores acima especificados sobre o

parâmetro investigado. Adicionalmente, o modelo ajustado será utilizado na simulação da degradação dos CGA durante o período de estocagem.

A minimização da degradação de CGA na erva-mate seca através de metodologias alternativas e/ou controle das condições de operação envolvidas no beneficiamento é de grande importância para a comercialização deste produto. A disponibilidade de um produto processado com alta concentração de fenóis (CGA) e que permita a obtenção de chás com características sensoriais semelhantes à dos mundialmente conhecidos chá preto inglês e chá verde japonês apresentaria grande potencial de conquista de mercados externos (KILMARTIN E HSU, 2003). Deve-se destacar que a produção nacional de erva-mate no ano de 2000 (LOURENÇO *et al.*, 2000) correspondia a apenas aproximadamente 8% da produção mundial do chá verde e do chá preto alcançada em 1996 (TEMPLE, 1999). Estes números destacam o grande potencial de mercado no que se refere à exportação de erva-mate e/ou de bebidas derivadas desta matéria-prima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentadas inicialmente algumas informações sobre as características da planta de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), bem como sobre sua importância sócio-econômica e processamento. Embora os tipos de enzima encontrados na erva-mate e os seus respectivos mecanismos de ação também sejam abordados nesta seção, bem como a caracterização do substrato investigado, o foco da presente revisão é a descrição e definição da ordem de grandeza dos fatores que afetam a cinética enzimática. Em especial pretende-se apresentar as concentrações de CGA tipicamente encontradas neste produto, assim como as temperaturas nas diferentes etapas de processamento. Estes dados referenciam as condições da cinética *in vivo*, o que é útil para estabelecer uma relação entre o presente trabalho e a oxidação natural dos CGA na erva-mate. Por último são apresentados alguns resultados recentes reportados na literatura de investigação da cinética de oxidação enzimática de CGA.

2.1. Erva-Mate

2.1.1. Características da Planta e Importância Sócio-Econômica

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta com propriedades organolépticas, nutritivas e farmacológicas que a tornam atrativa do ponto de vista comercial (BASTOS, 2006; MACCARI JR, 2005). Trata-se de uma das 600 espécies da família das Aquifoliáceas (HECK e MEJIA, 2007). Somente no Brasil, existem 68 espécies do gênero *Ilex* (MACCARI JR, 2005), ao qual a erva-mate pertence, sendo que cinco destas podem ser destinadas ao consumo em escala (CENI, 2005). A erva-mate é proveniente das regiões de clima temperado e, portanto, pode resistir a temperaturas relativamente baixas (HECK e MEJIA, 2007). Sua área de ocorrência envolve territórios do Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil, onde se encontra dispersa nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e em pequenas partes do Mato Grosso do Sul (ABITANTE, 2008; CENI, 2005; MACCARI JR, 2005; ESMELINDRO *et al.*, 2002).

O número de pequenas e médias indústrias de processamento de erva-mate (estimado entre 600 e 700) e as aproximadamente 180 mil propriedades rurais envolvidas no cultivo, somadas ao elevado número de empregos e a uma receita anual equivalente a R\$ 150-180 milhões decorrentes desta atividade salientam a importância sócio-econômica da

erva-mate (SEAB PARANÁ, 1993; VILCAHUAMAN, 1999; LOURENÇO *et al.*, 2000). A produção nacional de erva-mate visa atender principalmente o mercado interno, onde o produto final constituído de folhas e ramos desidratados é consumido em grande escala para o preparo de bebidas obtidas por infusão (KAWAKAMI E KOBAYASHI, 1991). Embora os investimentos do setor ervateiro tenham sido irrelevantes no sentido de implementar pesquisas, os resultados oriundos do crescente número de investigações sobre erva-mate sugerem que, basicamente, a expansão do setor ervateiro está condicionada a minimização dos custos de produção e melhoria da qualidade do produto final (ZANOELO *et al.*, 2007), bem como a extração e exploração dos componentes químicos da erva-mate (ex.; CARDOZO JR *et al.*, 2007).

2.1.2. Beneficiamento

No contexto do presente trabalho, o beneficiamento é um aspecto importante a ser descrito, visto que a oxidação enzimática somente poderá ocorrer a partir do momento em que as diferentes organelas contendo os CGA e as enzimas forem rompidas, o que ocorre em maior grau durante as etapas de beneficiamento, gerando o contato necessário entre substrato e catalisador (GEYSEN, 2006; MELO, 2005). Além disso, como já citado anteriormente, a motivação maior desta investigação é a obtenção de dados que permitam propostas de novas técnicas de processamento, ou de alteração das condições de operação atualmente empregadas, para minimização da degradação dos CGA por oxidação enzimática e química.

Basicamente o processo de beneficiamento da erva-mate envolve as etapas de colheita, recepção, desativação enzimática, secagem, moagem, classificação granulométrica, mistura, armazenagem, embalagem e expedição (ESMELINDRO *et al.*, 2002; BASTOS, 2006;). A desativação enzimática, secagem e o armazenamento são as etapas mais importantes do beneficiamento (SCHMALKO *et al.*, 1997), principalmente porque nestas etapas a ação do calor favorece a ruptura das organelas e a mistura enzima-substrato.

A desativação enzimática é um processo térmico ao qual é submetida a matéria-prima e que visa evitar o escurecimento das folhas *in natura* por ação de enzimas polifenoloxidasas e peroxidases (ESMELINDRO *et al.*, 2002). O método tradicional

consiste na passagem do material em um cilindro rotativo e inclinado, aquecido pelo contato com gases de combustão que são introduzidos no cilindro no mesmo sentido e direção de movimento dos sólidos. A alta temperatura de alimentação dos gases, da ordem de 300-350°C (SCHMALCKO *et al.*, 1997), e o contato contínuo fluido-partícula ao longo do cilindro provocam a desnaturação (parcial ou reversível) das enzimas e uma pré-secagem do material de 60±5% a valores aproximadamente iguais a 20±15% (b.u.).

A secagem da erva-mate é uma operação realizada para remover a umidade residual do produto oriundo do processo de desativação para valores inferiores a 10% (b.u.). A remoção de água ocorre devido à transferência de massa por difusão e convecção do sólido para o fluido de secagem (ZANOELO *et al.*, 2007), o qual pode ser ar quente, vapor superaquecido ou classicamente gases de combustão de lenha. Frequentemente secadores rotativos são utilizados, porém o emprego de secadores de esteira é também relativamente comum. Normalmente a operação de secagem ocorre de forma contínua por contato fluido-partícula em temperaturas entre 90 a 140°C (ZANOELO, 2005; ZANOELO *et al.*, 2007).

A armazenagem (estocagem) é também uma etapa relevante do processo de beneficiamento devido às inúmeras reações químicas e enzimáticas, conferindo diferentes aromas e cores ao produto final (SANTOS, 2004). Entretanto, devido à etapa de desativação enzimática, longos períodos de estocagem são necessários para que de fato ocorram variações significativas do produto. Cabe aqui ressaltar, que mesmo quando o tempo de armazenagem é intencionalmente prolongado para que estas reações ocorram, como é o caso erva-mate destinada ao mercado Argentino e Uruguaio, o processo é conduzido de forma completamente empírica. As temperaturas típicas de estocagem em ambiente natural e artificial são aproximadamente iguais a 25°C (SANTOS, 2004) e 50-60°C (VALDUGA, 1994), respectivamente.

Na realidade, os resultados obtidos na presente investigação poderão ser relevantes para simulação da oxidação do 5-CQA e demais CGA durante a estocagem, onde a atividade residual da enzima aliada ao longo tempo de estocagem pode ser responsável por uma redução significativa do 5-CQA (BRAVO, 2007).

2.2. Composição Química da Erva-Mate

Assim como a morfologia da planta é afetada por fatores genético-ambientais e pelas condições climáticas, estudos têm apontado que a composição química e a qualidade da erva-mate também dependem destes parâmetros (SOUZA *et al.*, 2008). Adicionalmente a estes fatores, a constituição do solo (ZAMPIER, 2001; CARDOZO JR *et al.*, 2007; VALDUGA, 1994), época de colheita, metodologia de processamento (ZANOELO, 2006; BASTOS, 2006) e condições de armazenagem (MACCARI JR, 2005) influenciam na concentração dos componentes químicos da erva-mate, e particularmente no conteúdo de fenóis (PRIGENT, 2005; ZANOELO, 2006; BASTOS, 2006; BIXBY, 2004).

De modo geral, independente das variáveis acima citadas, a composição química da erva mate inclui a presença das seguintes classes de compostos: fenóis; ácidos fenólicos; aminoácidos; compostos nitrogenados; ácidos graxos; antocianinas; ácidos terpênicos; álcoois; carboidratos; vitaminas; carotenóides e metilxantinas (CARDOZO JR *et al.*, 2007; MACCARI JR, 2005). Apesar desta abundância de famílias e compostos, apenas os fenóis, as saponinas e as metilxantinas são os grupos de espécies que vem recebendo maior atenção dos pesquisadores. Este interesse se deve às suas quantidades expressivas na matéria prima *in natura* e à importância farmacológica dos mesmos (ex.; CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; BRAVO, 1998; BRAVO *et al.*, 2007).

2.2.1. Ácidos Clorogênicos

Dentre as classes de compostos de maior interesse presentes na erva-mate, recentemente têm sido dada particular atenção aos ácidos fenólicos, especialmente aos CGA (CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP *et al.*, 2001; NEGISHI *et al.*, 2004).

Os ácidos clorogênicos (CGA) são compostos fenólicos bioativos encontrados em diversos alimentos e bebidas de origem vegetal como, por exemplo, frutas, legumes, café (CLIFFORD, 1999), vinho e chás (KILMARTIN e HSU, 2003; LIMA e MELO, 2004). Estes compostos estão presentes em altas concentrações na erva-mate *in natura* (CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP *et al.*, 2001; ANESINI, 2006; SANTOS, 2004; BASTOS, 2006; BRAVO *et al.*, 2007).

Quimicamente, os CGA são um grupo de ésteres formados entre ácidos trans-cinâmicos e ácido quínico. Os CGA's podem ser subdivididos em grupos de monoésteres do ácido caféico, ácido p-cumárico (pCoQA) e ácido ferrúlico (FQA); di, tri e tetra-ésteres do ácido caféico, respectivamente denominados diCQA, triCQA e tetraCQA; combinação de di-ésteres do ácido caféico e ferrúlico (CFQA) e de di-ésteres do ácido caféico e sinápico (CsiQA); e combinações de ésteres do ácido caféico e de ácidos oxálicos, succínicos e glutáricos (CLIFFORD, 1999, CLIFFORD, 2000). Existem vários isômeros nos grupos acima reportados, os quais diferem basicamente pelas posições de esterificação por parte dos grupos acila.

A importância destes compostos é salientada devido ao fato de que a soma das concentrações dos isômeros de CGA pode ultrapassar consideravelmente o percentual de outros compostos na erva-mate, como os alcalóides (CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1990). Além disso, a ingestão de CGA, através de diferentes bebidas obtidas por infusão de folhas de erva-mate, tem sido associada à inibição de certos neoplasmas em seres humanos e à atividade antioxidante dos fenóis (IARC, 1991; TANAKA e MORI, 1995; GUGLIUCCI, 1996; BIXBY *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado que os riscos de doenças de origem cardíaca também podem ser atenuados com dietas ricas nestes compostos (HECK e MEJIA, 2007).

Dentre os membros da família dos CGA, o ácido 5-*o*-cafeoilquínico, o qual é reportado como 5-CQA (Figura 2.1), é um dos mais abundantes e comumente encontrados em frutas e vegetais (DE MARIA *et al.*, 1999). Além disso, com exceção do isômero 3-CQA, é o único disponível comercialmente. Por estas razões é freqüentemente escolhido como um composto modelo para estudar derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e os compostos fenólicos simples (PRIGENT, 2005). No caso da erva-mate, é o composto fenólico mais abundante, e corresponde a 15-25% do total de CGA's encontrados nas folhas e ramos desta planta (CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; NEGISHI *et al.*, 2004).

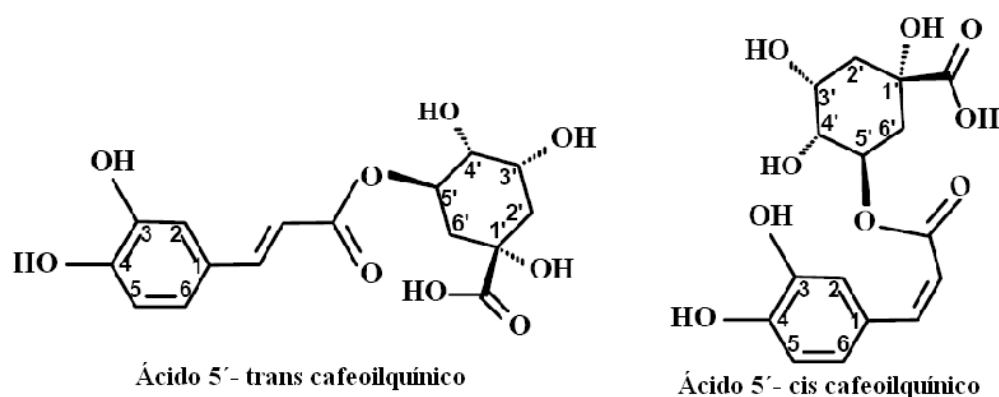


Figura 2.1 – Ácido 5-*o*-cafeoilquínico, 5-CQA. Fonte: PRIGENT, (2005)

O 5-CQA é formado por uma molécula de ácido caféico esterificado com ácido quínico na posição 5 do anel aromático (CLIFFORD, 2000). Apesar de ser um composto amplamente encontrado, suas propriedades físico-químicas são pouco conhecidas. A Tabela 2.1 apresenta as informações disponíveis na literatura a respeito das características químicas deste composto.

Tabela 2. 1- Propriedades químicas e físicas do 5-CQA (PRIGENT, 2005).

Nome IUPAC	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Temperatura de fusão (°C)	Densidade (g cm ⁻³)
Ácido 3-[[3-(3,4-Dihidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]oxi]-1,4,5 trihidroxíciclohexanocarboxílico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	207-209	1,28

2.3. Enzimas Presentes na Erva-Mate

Na erva-mate, assim como em outras plantas e frutas, observa-se a ação enzimática em processos de corte, trituração e moagem. Estes processos são caracterizados por um aspecto escuro oriundo de complexas reações iniciadas com a oxidação enzimática de compostos fenólicos, cujos grupos cromóforos causam reações de mudança de cor resultantes da interação dos compostos fenólicos entre si e/ou com as proteínas (CHEYNIER e MOUTONET, 1992; PRIGENT, 2005). Este escurecimento é facilmente observado

quando as frutas estão estragadas e envolve a ação das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) (CENI, 2005; ARAÚJO, 1995). A peroxidase requer a presença de peróxido no meio ativo, o que restringe seu espectro de ação comparado à polifenoloxidase.

As enzimas oxidativas (PPO e POD), identificadas por Senglet em 1928, além de catalisar a degradação de fenóis, são responsáveis pela produção de compostos organolepticamente indesejáveis (GÓMEZ-LOPEZ, 2002; FUJITA, 1995). Na indústria alimentícia, a degradação enzimática de frutas e vegetais *in natura* acarreta perdas econômicas consideráveis, além da diminuição da qualidade nutritiva e das alterações nas características dos alimentos (MAYER, 2006; NÚÑEZ-DELICATO *et al.*, 2000).

Apesar da evidência da presença de peroxidases e polifenoloxidases em folhas de erva-mate e da importância deste fator para a qualidade do produto industrializado, a literatura é ainda bastante escassa no que tange ao estudo das enzimas na erva-mate. (MAYER e HAREL, 1979).

2.3.1. Polifenoloxidases

Polifenoloxidase, monofenol oxidase (tirosinase, EC1.14.18.1), catecol oxidase ou o-difenol oxigênio redutase, são algumas das diferentes nomenclaturas que uma enzima responsável pela oxidação de fenóis pode receber (MAYER, 2006; FARIA *et al.*, 2007). As distintas designações são fornecidas devido ao tipo de substrato catalisado; e/ou devido à atividade da enzima (cresolase, catecolase, difenolase e fenolase) (RICHARD-FORGET e GAUILLARD, 1997).

A polifenoloxidase é sintetizada somente em tecidos em desenvolvimento e estocada nos plastídeos (MELO, 2005; GEYSEN, 2006). A enzima PPO é encontrada praticamente em todos os tecidos vegetais, em concentrações especialmente altas em cogumelo, batata, pêssego, maçã, banana, manga, folhas de chá, abacate e café (BOUCHILLOUX, 1963).

Embora o sítio ativo da enzima, caracterizado por um centro cúprico dinuclear (Cu^{+2}), seja uma característica invariável, as PPO, que além de plantas, podem também ser encontradas em animais e fungos, mostram uma variabilidade considerável quanto à seqüências de aminoácidos, o tamanho, glicosilação e ativação entre as espécies (Figura 2.2) (CENI, 2005; Mayer, 2006). Assim, a maioria das PPO de plantas e fungos existe

em múltiplas formas como formas imaturas, formas maduras e latentes, e formas ativas (MAYER, 2006; FARIA *et al.*, 2007).

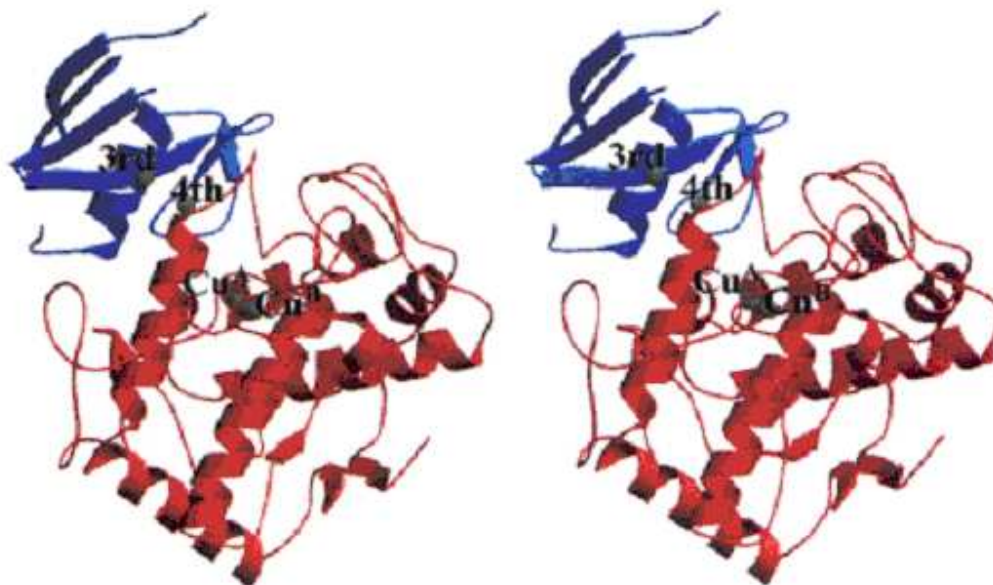


Figura 2.2 Estrutura da tirosinase (PPO) de *Streptomyces casteneoglobisporus*. Adaptado de MATOBA *et al.*, (2006) referenciado por MAYER, (2006).

A massa molar das polifenoloxidasas varia de 57 a 62 kDa, com exceção da PPO do cogumelo que apresenta 128 kDa, possuindo duas cadeias maiores com 43-45 kDa cada, onde estão os sítios ativos, e duas menores com 13 kDa cada (ARAÚJO, 1995).

Muito das características das PPO é ainda desconhecido, sobre sua função biológica, especialidade em plantas e fungos (MAYER, 2006). Em plantas há uma correlação positiva entre os níveis de polifenoloxidase e a resistência a patógenos e herbívoros é relatada, embora não existam muitos casos publicados (MELO, 2005; MAYER, 2006).

As PPO (EC 1.14.18.1) são divididas em catecol oxidases e lacases; ambas oxidam substratos fenólicos (OSUGA *et al.*, 1994). As catecol oxidases podem catalisar a oxidação dos *o*-difenois em *o*-quinonas usando a atividade catecolase (MAYER e HAREL, 1979). As lacases, por sua vez, catalisam reações de oxidação, dimetilação e polimerização de compostos fenólicos. (MAYER, 1987). Adicionalmente, a atividade cresolase pode converter monofenóis em *o*-difenois (MAYER AND HAREL, 1979; RODRÍGUEZ-LÓPEZ *et al.*, 1992) (Figura 2.3).

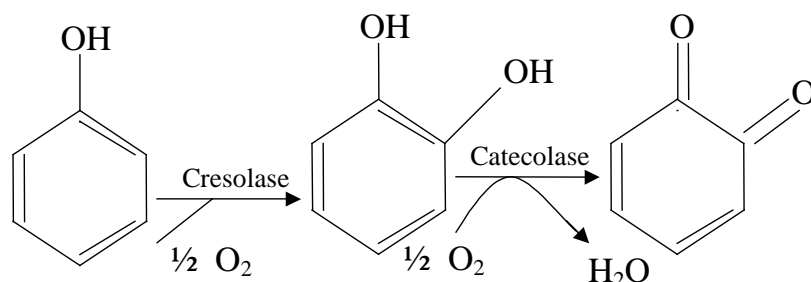


Figura 2.3 - Atividades cresolase e catecolase da polifenoloxidase. Adaptado de MATHEIS and WHITAKER, (1984), referenciado por PRIGENT, (2005).

Inúmeros trabalhos têm sido citados com diversos substratos catalisados pela PPO (CHEYNIER e MOUTONET, 1992). No entanto, esta enzima pode demonstrar preferência por um determinado substrato. Neste contexto, os CGA têm sido citados como os principais compostos catalisados pela PPO (GEYSEN, 2006; MARTINEZ e DUVNJAK, 2006).

O pH ótimo de atuação da PPO pode variar com a fonte de origem do substrato. Entretanto, a Tabela 2.2 demonstra que, na maioria dos casos, o pH ótimo de atuação encontra-se entre 6 e 7, sendo a enzima inativada em pH 4,0 ou abaixo. Na presente investigação, será utilizada PPO extraída de fungos (Sigma-Aldrich), conhecida como tirosinase.

Tabela 2. 2 - pH ótimo das polifenoloxidases de diversos produtos.

Produto de origem	pH ótimo	Referência
Erva mate	7,5	CENI, 2005
Marula	7,0	MDLULI, 2005
Beterraba	7,0	LIU, 2007
Thymbra .	7,0	DOGAN,2006
Suco de maçã	6,0	GUI <i>et al.</i> , 2007
Café	6,5	MAZZAFERA, 2000
Café, chá preto e verde, chá oolong	7,0	KILMARTIN e HSU , 2003
Tirosinase comercial Sigma	7,0	PRIGENT, 2005

2.3.2. Mecanismo de Reação da Tirosinase

Admite-se que o mecanismo de oxidação orto-difenol por tirosinases possa ser modelado através da cinética de Michaelis-Menten (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995; HALAOULI, 2006). Dependendo da valência do íon cobre (Cu) e da ligação com o oxigênio molecular, o sítio ativo das tirosinases poderá existir em três estados intermediários: deoxi (Cu I – Cu II), oxi (Cu II – O₂ – Cu II) e met (Cu II – Cu II) (SANCHEZ-FERRER; *et al.*, 1995; FARIA *et al.*, 2007). A forma met é convertida na forma deoxi, esta é hábil para fixar oxigênio reversivelmente o que levará à oxi-forma.

A tirosinase pode agir em monofenóis por causa da mistura das formas met e oxi-tirosinase, as quais existem na forma nativa da enzima. Contudo, as cinéticas são complexas devido ao fato dos monofenóis poderem se ligar a ambas formas da enzima. Esta situação torna-se mais complexa, pois os produtos da reação enzimática, as *o*-quinonas, são instáveis e assim, reagem rapidamente, gerando o-difenóis no meio de reação. No caso do substrato tirosina, num processo de ciclização e subsequente oxi-redução, as *o*-quinonas, geram diretamente o-difenol por reações não enzimáticas (FENOLL; *et al.*, 2001; FARIA *et al.*, 2007).

2.4 Caracterização das Variáveis que Afetam a Cinética Enzimática

No presente estudo pretende-se correlacionar a taxa de uma reação enzimática com alguns dos fatores que a afetam, em especial a concentração de substrato e a temperatura. Embora a concentração de enzimas e de oxigênio sejam parâmetros importantes em uma investigação enzimática (ARAÚJO, 1995; LIMA *et al.*, 2001), os mesmos não serão estudados neste trabalho. A dependência da atividade enzimática das polifenoloxidasas com o pH será também investigada, porém os ensaios cinéticos serão conduzidos em pH constante. Neste contexto, nesta seção é apresentada uma breve descrição do efeito da concentração de substrato, da temperatura e do pH sobre a cinética enzimática.

2.4.1. Substrato

A maior parte das enzimas envolve não apenas um, mas na realidade dois substratos. O segundo substrato, em muitos casos, pode ser a água, ou o oxigênio

molecular. Nestas situações, o modelo cinético de dois substratos admite uma simplificação quando um dos substratos é mantido em concentrações constantes para investigação do efeito da concentração do outro substrato na velocidade. Desta forma, a relação pode ser tratada por uma equação da forma Michaelis-Menten.

A velocidade das reações enzimáticas, as quais geralmente são descritas pelo modelo de Michaelis-Menten (DORAN, 1995), é caracterizada por uma razão entre dois polinômios de 1ª ordem com dois parâmetros ajustáveis (Equação 2.1). Na equação, v_{max} representa a velocidade máxima de reação, enquanto que K_M equivale à concentração de substrato necessária para que se obtenha metade da velocidade máxima possível.

Resumidamente, pode-se dizer que um diagrama da velocidade no tempo zero em função da concentração de substrato inicial é freqüentemente representado por uma hipérbole (MARTINEZ e DUVNJAK, 2006) com crescimento da velocidade com o aumento da $[S]_o$.

$$v_o = -\left. \frac{d[S]_o}{dt} \right|_o = \frac{k_{cat}[E][S]_o}{K_M + [S]_o} = \frac{v_{max}[S]_o}{K_M + [S]_o} \quad (2.1)$$

Da expressão de Michaelis-Menten com $[S]=[S]_o$ é possível notar que quando a concentração inicial de substrato é muito superior ao parâmetro K_M a velocidade inicial de reação é equivalente à velocidade máxima. Isto faz com que a reação comporte-se como uma equação de ordem zero, ou seja, (a velocidade da reação é independente da concentração do substrato).

$$v_o = \frac{v_{max}[S]_o}{K_M + [S]_o} = \frac{v_{max}[S]_o}{K_M \ll [S]_o} = \frac{v_{max}[S]_o}{[S]_o} = v_{max} \quad (2.2)$$

Entretanto, como já mencionado, quando a concentração inicial de substrato for igual ao valor do parâmetro K_M a velocidade inicial de reação será igual à metade da velocidade máxima (Equação 2.3). Deste modo, a utilização de concentrações de substrato iguais ao valor do parâmetro K_M fará com que se obtenha velocidades iniciais que correspondem à metade da velocidade máxima.

$$v_o = \frac{v_{max}[S]_o}{K_M + [S]_o} = \frac{v_{max}[S]_o}{[S]_o + [S]_o} = \frac{v_{max}[S]_o}{2[S]_o} = \frac{v_{max}}{2} \quad (2.3)$$

De forma análoga aos casos representados pelas Equações (2.2) e (2.3), quando a concentração inicial de substrato for muito inferior ao parâmetro K_M admite-se a simplificação representada pela Equação (2.4). Nesta situação, a cinética enzimática é representada por uma equação de primeira ordem, sendo a velocidade diretamente proporcional à concentração de substrato.

$$v_o = \frac{v_{max}[S]_o}{K_M + [S]_o} = \frac{v_{max}[S]_o}{k_M \gg [S]_o} = (v_{max} / k_M)[S]_o \quad (2.4)$$

Esta análise do efeito da concentração de substrato sobre a caracterização da curva de Michaelis-Menten é utilizada para definição das concentrações iniciais de substrato nos ensaios experimentais, como será observado detalhadamente no capítulo 3. Visto que a presente investigação visa também simular a oxidação enzimática do 5-CQA durante a estocagem de erva-mate é importante que se tenha ciência de que as concentrações do ácido 5-CQA neste produto variam de aproximadamente 0,3 a 3,3 % da massa seca. Este percentual foi estimado com base nas quantidades de ácidos clorogênicos totais e no percentual do 5-CQA nos CGA's reportados na literatura. De fato, diversos trabalhos científicos indicam que a erva-mate apresenta concentrações de ácidos clorogênicos totais na faixa de 2 a 13% da massa seca (CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP *et al.*, 2001; NEGISHI *et al.*, 2004; BRAVO *et al.*, 2007). Dentre os diferentes compostos pertencentes a esta família o 5-CQA é o mais abundante e corresponde a 15-25% do total de CGA's (CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; NEGISHI *et al.*, 2004).

2.4.2. Temperatura

A maioria das reações se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Um aumento na temperatura imprime maior energia cinética às

moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões reativas por unidade de tempo.

As enzimas são estruturas complexas, cuja atividade catalítica provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada que justapõe os grupamentos específicos dos aminoácidos de tal modo a formar sítios estereo-específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. A estrutura terciária de uma enzima é mantida principalmente por um grande número de ligações não covalentes fracas. Em termos práticos, uma molécula de enzima é uma estrutura delicada e frágil. Se a molécula absorve energia demais, a estrutura terciária rompe-se e a enzima ficará desnaturada (Figura 2.4), isto é, perderá a atividade catalítica. Logo, à medida que a temperatura cresce, o esperado aumento na velocidade de reação, resultante do aumento das colisões entre enzima e substrato, é minimizado devido ao aumento da velocidade de desnaturação (LEHNINGER, 1995).

Embora o aumento da temperatura possa provocar um rompimento da estrutura tridimensional da enzima, provocando sua desnaturação, na presente investigação os ensaios serão conduzidos em uma faixa de temperatura onde este efeito é pouco acentuado. Basicamente a máxima temperatura dos ensaios será definida a partir de dados da literatura (MARTINEZ E DUVNJAK, 2006). Sabe-se que os substratos freqüentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor, presumivelmente porque a ligação com o substrato estabiliza a estrutura tridimensional da enzima, logo o tipo de substrato deve interferir na faixa de temperatura na qual o fenômeno de desativação enzimática ocorre de forma predominante. Neste sentido, a faixa de temperatura escolhida para os ensaios experimentais desta investigação será baseada em dados da literatura que envolvem o mesmo substrato aqui utilizado.

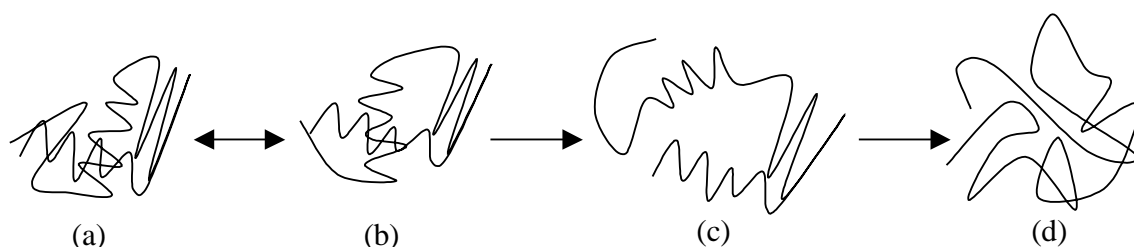


Figura 2.4 - Processo de desnaturação enzimática. (a) Estrutura tri-dimensional nativa estabilizada por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas. (b)

Estrutura desestabilizada pelas vibrações térmicas (pode ter atividade, às vezes maior que a nativa, se a estrutura for mais flexível). (c) Estrutura nativa tri-dimensional totalmente rompida (estrutura secundária mantida, mas provavelmente sem atividade). (d) Rolo aleatório. Fonte: MITCHELL, (2008)

Em um intervalo de temperatura caracterizado por um efeito desprezível da desnaturação enzimática sobre a reação, a expressão de Arrhenius (Equação 2.5) freqüentemente representa satisfatoriamente a variação de velocidade com a temperatura. Sendo assim, o parâmetro v_{max} do modelo de Michaelis-Menten (Equação 2.1) poderá ser correlacionado a temperatura através da Equação (2.5).

$$v_{max} = A_o \exp \left[\frac{-E_a}{R(T + 273)} \right] \quad (2.5)$$

As PPO não pertencem ao grupo de enzimas estáveis a altas temperaturas. Curtas exposições em temperaturas entre 70° e 90°C podem ser suficientes, mesmo que temporariamente, para reduzir apreciavelmente a atividade desta enzima (CENI, 2005; ARAÚJO, 1995).

2.4.3. pH

O efeito do pH na estabilidade e atividade da enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema. Os sítios ativos das enzimas são freqüentemente compostos por grupos ionizáveis, estes devem se encontrar numa forma iônica adequada para que mantenham a conformação do sítio ativo e liguem-se aos substratos catalisando a reação (LEHNINGER *et al.*, 1995; CORNISH BOWDEN, 1995).

O efeito do pH na estabilidade está relacionado com o papel dos grupos dissociáveis na estabilidade da estrutura tridimensional da enzima. Quando a enzima encontra-se em seu pH ótimo para a estabilidade, existirão grupos carregados e neutros que trabalham em conjunto de forma a manter a conformação da enzima estável. Com a mudança de pH, grupos que anteriormente eram carregados, podem se tornar neutros, e então a contribuição destas ligações é perdida. Além disso, grupos dissociáveis que eram neutros no pH ótimo podem ficar carregados, podendo causar repulsão dentro da molécula, desestabilizando-a.

Adicionalmente, a estabilidade de uma enzima ao pH também pode depender de fatores como (a) temperatura, (b) força iônica, (c) natureza química do tampão, (d) concentração de vários conservantes (glicerol, compostos sulfidrílicos), (e) concentração de íons metálicos contaminantes, (f) concentração de substratos ou cofatores da enzima, e (g) concentração da enzima.

As enzimas contêm muitas cadeias laterais ácidas/básicas que, como citado anteriormente, podem ser protonadas ou não, dependendo do pH do meio reacional. Na catálise, portanto, o “estado de protonação” dos grupos envolvidos poderá determinar se a enzima está ativa ou não. Analogamente, o estado de ionização do substrato também pode afetar a velocidade da reação. Aspectos como estes podem afetar a conformação da enzima, e conseqüentemente a atividade.

A análise das reações com substrato pode ser mais complexa, pois as constantes de dissociação do complexo enzima-substrato podem ser diferentes das constantes de dissociação da enzima livre. Desta forma, a atividade catalítica pode ser restrita a uma pequena faixa de pH, na qual os experimentos são conduzidos. O pH ótimo de atuação da enzima pode ser determinado através da curva na qual a enzima possui maior atividade. A curva é obtida pela taxa de consumo de substrato em um determinado tempo, em valores de pH indicados. Então, determina-se o melhor pH para um determinado experimento.

O pH ótimo de atuação da maior parte das catecol oxidases encontra-se na faixa de 6,0 a 7,0. A atividade da tirosinase de cogumelos foi reportada com pH ótimo igual a 7,0 sendo que a enzima reduz consideravelmente sua atividade em valores de pH abaixo de 4,0. (ARAÚJO, 1995; MCCORD e KILARA, 1983; PRIGENT, 2005). Ratifica-se que neste trabalho, os ensaios cinético-enzimáticos de determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten serão conduzidos em um valor fixo de pH, próximo à condição ótima de atividade enzimática, a qual será determinada experimentalmente.

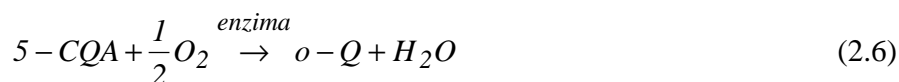
2.5. Mecanismo Enzimático de Oxidação do 5-CQA na Erva-Mate

A degradação dos CGA inicia-se no processamento ervateiro, quando a erva-mate é cortada. Nesta situação, o tecido vegetal é danificado e ocorre o rompimento do vacúolo que libera compostos fenólicos no meio foliar (MAYER e HAREL, 1979). Analogamente,

a ruptura dos plastídeos propicia que as enzimas entrem em contato com os fenóis e com o ar catalisando as reações oxidativas (GEYSEN, 2006).

O 5-CQA é um dos substratos oxidados pela ação das polifenoloxidasas (PPO) na erva-mate. Em um primeiro estágio, a oxidação do 5-CQA por PPO produz elementos chamados clorogenoquinonas (MELO, 2005). As quinonas são instáveis, e tendem a reagir espontaneamente por mecanismos de oxido-redução, oligomerização (com fenóis), ou formando ligações covalentes com outras moléculas como proteínas (PRIGENT, 2005; CENI, 2005). Devido a estas propriedades das quinonas, diferentes vias metabólicas têm sido sugeridas para explicar as reações subsequentes.

PIERPOINT (1966) sugeriu que a oxidação do 5-CQA segue o curso similar da oxidação do catecol (Reações 2.6 a 2.10). Neste mecanismo, o primeiro passo é a formação enzimática da *o*-quinona. As reações não enzimáticas posteriores convertem $\frac{1}{2}$ mol de *o*-quinona (*o*-Q) em ácido hidroxiclorogênico (AHC), o qual reagirá novamente com a quinona formando hidroxiquinona (HQ) e regenerando o ácido clorogênico. A polimerização da hidroxiquinona produz a cor marrom.



No que diz respeito à ação da peroxidase(POD), esta é uma enzima que exige a presença de peróxido de hidrogênio, o que a torna com espectro de ação limitado em comparação à polifenoloxidase (PPO) (PRIGENT, 2005). Muitos estudos atribuem que esta enzima tenha uma ação conjugada à da PPO no processo de escurecimento enzimático. Outros consideram o envolvimento das POD no escurecimento enzimático questionável, devido ao fato das PPO terem uma alta afinidade pelo 5-CQA e da quantidade de H₂O₂ nas

plantas ser baixa (RICHARD-FORGET e GAUILLARD, 1997). Contudo estes mesmos autores sugerem que as PPO, ao catalisarem o 5-CQA podem liberar H_2O_2 e as *o*-quinonas no meio reacional, propiciando desta maneira a ação das peroxidases. A quantidade liberada de peróxido no meio reacional, nesta hipótese, variaria conforme a estrutura fenólica que a originou.

2.6. Valores de K_M Disponíveis na Literatura para a Reação de Oxidação do 5-CQA

A Tabela 2.3 apresenta uma sucinta explanação de alguns trabalhos que descrevem a degradação enzimática do 5-CQA por PPO, os quais foram utilizadas como referência para definição das condições experimentais adotadas nesta investigação.

Tabela 2.3 - K_M e condições experimentais cinéticas da oxidação do 5-CQA por PPO's.

Referência	Enzima	Substrato	K_M (mM)	Deteção	pH	T (°C)
GOETGHEBEUR e KERMASHA, 1996	PPO	CGA	0,20 e 0,31	Formação das	6,5	25
NEVES, 2007	PPO (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	CGA	1,14	<i>o</i> -Q a 420 nm com espectrofotômetro	6,0-6,5	30
MUNÕZ <i>et al.</i> , 2007	PPO (sigma)	CGA	0,87		7,0	25
MELO, 2005	PPO cafeeiro	5-CQA	1,5	Consumo de substrato a 324-326 nm com HPLC-UV	6,0	25
MARTINEZ e DUVNJAK, 2006	PPO (white-rot fungus T. versicolor ATCC 42530)	CGA	0,042		4,3	25

Os dados de K_M demonstrados nesta tabela também são importantes para validação do modelo cinético que será obtido nesta investigação. Porém, visto que o efeito da concentração de enzima não será estudado e a velocidade máxima é influenciada por esta variável, a comparação de valores do parâmetro v_{max} com dados da literatura não apresenta

utilidade prática. Neste sentido, valores do parâmetro v_{max} reportado nas referências da Tabela 2.3 não serão aqui apresentados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, é apresentada uma descrição dos materiais, equipamentos utilizados e dos procedimentos adotados para a determinação das velocidades das reações catalisadas por PPO (tirosinase) (Sigma-Aldrich, 5370 U mg⁻¹ de sólido, Lote 076K7034) utilizando como substrato 5-CQA (Sigma-Aldrich, Lote 096K1722, Pureza 98%). Resumidamente, a Tabela 3.1 apresenta as condições de operação utilizadas para estudo do efeito da concentração do substrato e da temperatura sobre a velocidade de oxidação do 5-CQA no pH ótimo da enzima. Os critérios utilizados para definição das condições reportadas na Tabela 3.1 serão detalhados a seguir.

Tabela 3. 1 - Condições experimentais para definição dos parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten e da equação de Arrhenius em pH=6,8 e $[E]_0=0,016\text{mg ml}^{-1}$.

Ensaio	$[S]_0$		T (°C)	Repetições
	mg ml ⁻¹	mM		
S1	0,016	0,045	32	2
S2	0,25	0,706	32	2
S3	0,5	1,411	32	2
T1	0,016	0,045	18	3
T2	0,016	0,045	25	3
T3	0,016	0,045	32	3
T4	0,016	0,045	39	3

A faixa de temperatura investigada foi definida em função das condições de temperatura usuais em investigações análogas reportadas na literatura (ver Tabela 2.3). A escolha da faixa de trabalho das temperaturas também foi baseada no fato de que a presente investigação tem por pretensão simular o efeito de oxidação enzimática durante a estocagem de erva-mate, a qual, como reportado no capítulo 2, ocorre próxima à temperatura ambiente.

Apesar da caracterização da curva de Michaelis-Menten na região de ordem zero necessitar de valores de $[S]_0 \gg K_M$, a sensibilidade do aparelho espectrofotométrico restringiu a escolha destes valores de concentração. Desta forma, as concentrações de

substrato foram determinadas em função dos valores de K_M reportados na literatura (Tabela 2.3), a fim de que houvesse uma distribuição uniforme no intervalo onde a taxa é de 1ª ordem ($[S]_0 \ll K_M$) e de ordem zero ($[S]_0 \gg K_M$).

3.1. Atividade Enzimática em Diferentes pH's

A atividade enzimática, normalmente expressa em unidades de atividade por volume reacional ($U\ ml^{-1}$), é uma medida da concentração de enzimas no meio reacional que leva em consideração o potencial de catálise da enzima utilizada. Em muitas situações, também pode ser empregado o termo atividade específica, que expressa a razão entre unidades de atividade (U) e a massa de proteína (LIMA *et al.*, 2001 referenciados por CENI, 2005). Existem diferentes definições para a unidade de atividade (CORNISH-BOWDEN, 1995), porém a mais usual é a que define U como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μ mol de substrato por minuto em condições de ensaio definidas. Na presente investigação este conceito será utilizado, porém os resultados serão apresentados na forma de atividade relativa, a qual é uma variável adimensional que refletirá a razão entre a atividade em uma certa condição de pH e a atividade no pH ótimo.

A fim de investigar o efeito do pH sobre a atividade enzimática e também para estabelecer o valor fixo de pH a ser utilizado nos diferentes ensaios cinéticos foram preparadas soluções tampões baseados em procedimentos sugeridos na literatura (STOLL e BLANCHARD, 1990). Em particular, os tampões fosfato (0,1 M) e citrato(50 mM)-fosfato (0,1 M) foram testados, pois a faixa de tamponagem de ambos contemplava valores de pH próximos à neutralidade, onde a tirosinase supostamente tem atividade ótima (ver Tabela 2.2) e onde experimentos cinéticos similares têm sido conduzidos (ver Tabela 2.3). O primeiro tampão é indicado para manter soluções com pH entre 5,7 e 8,0, enquanto que o segundo é sugerido para um intervalo mais amplo e baixo de pH's de 2,6 a 7,0. Ambos os tampões foram preparados de forma similar, ou seja, a partir da mistura e posterior diluição de soluções aquosas; no caso do tampão *citrato-fosfato* são as soluções A (0,1 M de ácido cítrico=19,21 g de ácido cítrico em 1000 ml) e B (0,2 M de fosfato de sódio dibásico=53,65 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ou 71,7 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ em 1000ml). Os reagentes para o preparo do tampão não foram purificados visto que possuíam um alto grau de pureza. Após o preparo do tampão, o pH foi medido e ajustado com as soluções de HCl e NaOH.

Os tampões foram testados antes dos ensaios experimentais de análise do efeito do pH sobre a atividade enzimática. O teste é necessário para verificar se o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) é função do pH. Quando se varia o pH do tampão em que o substrato é solubilizado e a absorbância não muda, comprova-se que não existe interação química entre o substrato (5-CQA) e os tampões (fosfato e citrato(50 mM)-fosfato(0,1M)) na ausência de enzimas, o que naturalmente alteraria os resultados obtidos de atividade enzimática. O tampão fosfato ao ser misturado com o 5-CQA em concentrações próximas as desejadas nos ensaios apresentou uma coloração amarelada, a qual obviamente caracteriza reação química e, portanto foi rejeitado. Esta coloração foi observada de forma mais pronunciada em altas concentrações de substrato. Entretanto, nenhuma interação foi notada visualmente ao utilizar-se o tampão *citrato-fosfato*, e sendo assim foi possível realizar os experimentos de atividade enzimática. Basicamente, o procedimento adotado consistiu no preparo de uma solução de 0,02 mg ml⁻¹ de 5-CQA e 0,02 mg ml⁻¹ de enzima com monitoramento de sua absorbância em pH 3,0, 4,0, 4,6, 5,8 e 6,8 a 25°C.

As medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro (UV 1100, Pró-Análise). A partir de um padrão comercial de 5-CQA, foi plotada uma curva de calibração de absorbância a 325nm versus concentração. A obtenção desta curva é equivalente à determinação do coeficiente de absorvidade molar do 5-CQA (ϵ). Sabe-se que o efeito da concentração do 5-CQA sobre a transmissão e a absorção da luz pode ser estabelecido pela lei de Beer-Lambert (MUÑOZ *et al.*, 2006), a qual indica que a absorção de um feixe de luz monocromático aumenta linearmente com o incremento da concentração da substância absorvente (Equação 3.1).

$$[5 - CQA] = \frac{I}{\epsilon l} A \quad (3.1)$$

Como será visto detalhadamente no capítulo 4 (seção 4.1), não houve alteração significativa da absorbância ou concentração da solução de 5-CQA no pH de 3-6,8 em tampão *citrato-fosfato* na ausência de enzimas. Este resultado, além de comprovar que o coeficiente de absorvidade molar não é função do pH, indica a viabilidade de utilização do

referido tampão para determinação experimental da atividade enzimática na faixa acima especificada de pH's.

Nos ensaios de atividade enzimática, uma solução de 1 ml de tampão *citrato-fosfato* contendo 0,02 mg de 5-CQA e 0,016 mg de enzima tirosinase comercial (Sigma-Aldrich) foi preparada em uma cubeta de vidro de $1 \times 1 \times 2,5$ cm³, vigorosamente agitada e levada ao espectrofotômetro. A reação de oxidação do 5-CQA pela enzima tirosinase foi acompanhada pela variação da absorbância a 325 nm em função do tempo nos diferentes valores de pH previamente estabelecidos. A velocidade inicial de oxidação do substrato em $\mu\text{mol min}^{-1}$ define o número de unidades de atividade em cada pH investigado. Como anteriormente especificado, os valores obtidos foram divididos pelas unidades de atividade no pH ótimo para determinação da atividade relativa.

3.2. Experimentos para Ajuste dos Parâmetros do Modelo Cinético

Com o objetivo de minimizar a quantidade de enzima e substrato no meio reacional, porém de forma a manter as concentrações desejadas destes produtos, os ensaios reportados na Tabela 3.1 foram conduzidos nas pequenas cubetas anteriormente especificadas (seção 3.1). Um espectrofotômetro (FENTO 700 PLUS) equipado com sistema de controle de temperatura (para realização dos ensaios em condições isotérmicas) foi empregado para monitoramento *on-line* (TREVISAN e POPPI, 2006) da variação da absorbância da solução reacional.

A reação foi acompanhada nos comprimentos de onda iguais à 325 nm para decréscimo de substrato e 400 nm para a formação das *o*-quinonas, respectivamente. Os valores correspondentes às curvas cinéticas foram obtidos através de um computador acoplado ao espectrofotômetro, o qual possui um programa desenvolvido propriamente para a captação dos dados.

As leituras de absorbância foram transformadas em concentração de substrato através do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) calculado experimentalmente para o 5-CQA, como descrito na seção anterior. Com estes dados, as curvas cinéticas que relacionam a variação da concentração de substrato com o tempo puderam ser traçadas. A velocidade inicial (v_o) foi determinada pelo ajuste polinomial dos dados, considerando o valor da primeira derivada no tempo zero.

3.2.1. Efeito da Concentração de Substrato

A influência da concentração de substrato em cinética enzimática classicamente envolve a determinação de velocidades iniciais para diferentes valores de $[S]_0$ em concentrações constantes de enzima. Este procedimento é adotado porque nas velocidades iniciais, fatores complicantes, como reversibilidade da reação, inibição pelo produto e inativação da enzima, são evitados (CORNISH-BOWDEN, 1995).

Entretanto, na presente investigação os dados de variação de concentração de 5-CQA em função do tempo para concentrações $[S]_0 > 0,016 \text{ mg ml}^{-1}$ (ensaios S2 e S3 da Tabela 3.1) não puderam ser obtidos visto que nestas concentrações iniciais de substrato o espectrofotômetro indicava leituras de absorbância acima da unidade, as quais não apresentam sensibilidade adequada a variação de concentração do substrato, podendo gerar medidas equivocadas. Desta forma, os experimentos da Tabela 3.1 em concentrações iniciais de 5-CQA iguais a 0,25 e 0,5 mg ml^{-1} foram conduzidos de forma a analisar a variação de absorbância dos produtos. Essencialmente, significa que as leituras de absorbância no espectrofotômetro foram realizadas tornando a absorbância igual a zero no tempo inicial de reação. Teoricamente, a variação de absorbância observada é devida ao aumento da concentração dos produtos. Na concentração inicial de substrato igual a 0,016 mg os experimentos foram repetidos de maneira a observar a variação de concentração de substrato a 325 nm e de produto a 400 nm. Como será visto a seguir, este procedimento foi necessário para que se pudesse converter os dados de variação de concentração de produto em $[S]_0 = 0,25$ e 0,5 mg ml^{-1} para dados de variação de concentração de substrato ao longo do tempo de reação.

Nos quatro ensaios descritos no parágrafo anterior, a concentração de enzima ($[E] = 0,016 \text{ mg ml}^{-1}$), a temperatura ($T = 32^\circ \text{C}$) e o pH (6,8) foram mantidos fixos. Os dados de leitura da variação da absorbância de formação do produto (400nm) foram convertidos em variação do decréscimo de substrato pela teoria da relação entre a velocidade inicial de substrato e de produto descrita posteriormente.

3.2.2. Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura na oxidação enzimática do 5-CQA foi estabelecido fixando-se a concentração inicial de substrato (0,016 mg ml^{-1}) e enzima (0,016 mg ml^{-1}) em

condições que pudessem permitir leituras de variação de absorbância na faixa de 0 a 1,0 (experimentos T1-T4, Tabela 3.1). Desta forma, a variação de concentração de substrato em função do tempo poderia ser diretamente observada nos 4 níveis de temperatura adotados (18, 25, 32 e 39°C).

Freqüentemente, o efeito da temperatura sobre a cinética é computado assumindo-se que o parâmetro v_{max} da equação de Michaelis-Menten segue uma dependência exponencial com a temperatura, como classicamente representado por Arrhenius. Entretanto, para que esta representação possa ser obtida, são necessários dados de velocidade inicial em uma concentração de substrato que permita a obtenção da velocidade máxima, o que não ocorre certamente na menor concentração de substrato da faixa investigada (0,016 mg ml⁻¹). Reitera-se que os ensaios para análise do efeito da temperatura foram conduzidos no menor valor de concentração de 5-CQA.

De qualquer forma, como a velocidade máxima é α vezes maior que a velocidade v_o em $[S]_o=0,016$ mg ml⁻¹, o parâmetro v_{max} pode ser prontamente correlacionado a temperatura, simplesmente multiplicando-se o fator de freqüência da expressão de Arrhenius em $[S]_o=0,016$ mg ml⁻¹ pelo parâmetro α . Este fator de correção será obtido dividindo-se v_{max} por v_o em $[S]_o=0,016$ mg ml⁻¹ e $T=32^\circ\text{C}$.

$$v_{max} = \alpha v_o [S]_o = 0,016 = \alpha A'_o \exp \left[\frac{-E_a}{R(T + 273)} \right] \quad (3.2)$$

3.3. Experimentos para Validação do Modelo Cinético

Ensaio experimentais nas concentrações iniciais de 0,2 e 0,4 mg de 5-CQA por ml de solução reacional com concentração de enzimas igual a 0,016 mg ml⁻¹ foram conduzidos numa faixa de temperatura análoga a indicada na seção 3.2. As concentrações de substrato são diferentes daquelas reportadas na Tabela 3.1, pois pretendia-se com estes dados adicionais validar o modelo cinético proposto por comparação com resultados experimentais em condições operacionais diferentes das utilizadas para ajuste dos parâmetros do modelo de Michaelis-Menten.

Estes ensaios adicionais não foram conduzidos em cubetas com medidas *on line* de absorbância do substrato ou produto, mas em tubos de ensaio (de aproximadamente 10 ml)

imersos em um banho termostático (TECNAL–TE-055) com recirculação e controle de temperatura. A solução inserida no tubo de ensaio envolvia uma mistura de 5-CQA e tirosinase nas concentrações especificadas anteriormente e diluídas em tampão *citrato-fosfato*. Alíquotas de 0,5ml eram retiradas periodicamente (cada 30 s) da proveta durante um intervalo de 4 min e adicionadas em microtubos do tipo *ependorf* contendo 0,5 ml de ácido tricloro acético 66%, de maneira a inibir a atividade enzimática devido ao pH baixo do meio, e interromper a reação. As alíquotas eram então congeladas a -5°C e armazenadas para posterior análise. A Tabela 3.2 apresenta resumidamente as concentrações iniciais de substrato e temperaturas adotadas.

Tabela 3.2- Condições experimentais para obtenção de dados adicionais para validação do modelo de Michaelis-Menten.

Ensaio	[S] ₀		T (°C)	Repetições
	mg ml ⁻¹	mM		
V1	0,2	0,0564	20	1
V2	0,2	0,0564	27	1
V3	0,2	0,0564	32	1
V4	0,2	0,0564	39	2
V5	0,6	0,1692	20	2
V6	0,6	0,1692	27	2
V7	0,6	0,1692	32	1
V8	0,6	0,1692	39	1

Após descongelamento das alíquotas, as mesmas foram diluídas e inseridas em cubetas para a leitura das absorbâncias a 325 nm. Com a leitura realizada, converteu-se a absorbância em concentrações de substrato, utilizando o coeficiente de absorvidade molar ϵ (calculado experimentalmente) do 5-CQA.

3.4. Tratamento de Dados

Nesta seção será apresentada a teoria necessária para converter os dados de absorbância dos produtos a 400 nm, obtidos de acordo com procedimento descrito no item

3.2.1, em dados de variação de concentração de substrato. Também serão descritos sucintamente os métodos aplicados para ajuste dos parâmetros da expressão de Michaelis-Menten (Equação 2.1) e Arrhenius (Equação 2.5) e o tratamento matemático necessário para obtenção de uma expressão algébrica que permita o cálculo da concentração de substrato durante o tempo de reação para diferentes valores de temperatura.

3.4.1. Relação entre as curvas de consumo de 5-CQA e de formação de *o*-Q

Como anteriormente postulado, sabe-se que absorbâncias variam linearmente com as concentrações, logo as Equações (3.3) e (3.4) podem ser escritas para o substrato e produto, respectivamente.

$$A_{5-CQA} = \varepsilon[5 - CQA] \quad (3.3)$$

$$A_{o-Q} = \varepsilon_{o-Q}[o - Q] \quad (3.4)$$

Assumindo que a oxidação do 5-CQA em *o*-Q possa ser representada de forma simplificada pela Reação (3.5) com coeficientes estequiométricos β e γ , então da definição de grau de avanço da reação (ξ) pode-se escrever a Equação (3.6).



$$\frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt} = -\frac{1}{\beta} \frac{d[5 - CQA]}{dt} = +\frac{1}{\gamma} \frac{d[o - Q]}{dt} \quad (3.6)$$

Isolando-se $[o - Q]$ da Equação (3.4) e substituindo-se na (3.6), obtém-se uma equação diferencial (Equação 3.7) que depois de multiplicada por dt resulta em uma expressão que pode ser facilmente integrada (Equação 3.8) no tempo zero, quando a absorbância das *o*-Q é igual a zero e $[5 - CQA] = [S]_0$, até o tempo t com absorbância experimentalmente determinada (A_{o-Q}) e concentração de substrato $[S]$, cujo valor pode ser obtido pela Equação (3.9).

$$\frac{1}{\beta} \frac{d[5-CQA]}{dt} = -\frac{1}{\gamma\epsilon_{o-Q}} \frac{dA_{o-Q}}{dt} \quad (3.7)$$

$$\int d[5-CQA] = -\frac{\beta}{\gamma\epsilon_{o-Q}} \int dA_{o-Q} \quad (3.8)$$

$$[S] = [S]_0 - \frac{\beta}{\gamma\epsilon_{o-Q}} A_{o-Q} \quad (3.9)$$

Finalmente observa-se que a constante $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$ representa o coeficiente angular em diagramas de concentração de substrato em função da absorbância das *o*-Q nos instantes iniciais de reação ($t \leq 45$ s). Dados experimentais que permitem a construção deste diagrama e estimativa do conjunto de parâmetros $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$ foram obtidos unicamente nas condições experimentais do ensaio S1 da Tabela 3.1.

Assumindo que $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$ é conhecido e independe das condições cinéticas, a Equação (3.9) pode ser utilizada para cálculo da concentração de substrato a partir de dados de absorbância dos produtos em determinados tempos de reação. Dados de concentração de substrato em função do tempo serão então obtidos e permitirão a estimativa das velocidades iniciais de oxidação do 5-CQA nas concentrações iniciais de substrato definidas nos ensaios S1-S3 da Tabela 3.1.

3.4.2. Ajuste dos parâmetros cinéticos e integração da expressão de Michaelis-Menten

Os procedimentos usuais para cálculo dos parâmetros v_{max} e K_M da Equação (2.1) envolvem a linearização da expressão de Michaelis-Menten através dos métodos denominados de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Langmuir (Hanes-Woolf), o que resulta nas Equações (3.10), (3.11) e (3.12), respectivamente.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{max} [S]_0} + \frac{1}{v_{max}} \quad (3.10)$$

$$\frac{v_0}{[S]_0} = \frac{v_{\max}}{K_m} - \frac{v_0}{K_m} \quad (3.11)$$

$$\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max}} + \frac{v_0}{v_{\max}} \quad (3.12)$$

Observa-se que dados de v_0 em função de $[S]_0$ são suficientes para obtenção dos parâmetros do modelo cinético. Na presente investigação foram obtidos pares ordenados destas variáveis nas condições dos ensaios S1 a S3 da Tabela 3.1. Os ajustes lineares foram feitos por mínimos quadrados. A determinação de v_{\max} e K_M também foi feita por ajuste não-linear, a partir da Equação (2.1), utilizando o algoritmo de Levenberg–Marquardt (LM).

O fator de frequência (A_o) e a energia de ativação (E_a) da expressão de Arrhenius podem ser obtidos por ajuste linear ou não-linear da Equação (2.5) através dos resultados de v_o versus T (experimentos T1 a T4 da Tabela 3.1) na concentração inicial de substrato igual a $0,016 \text{ mg ml}^{-1}$ (observe Equação 3.2).

A expressão de Michaelis-Menten (Equação 2.1) matematicamente representa uma equação diferencial ordinária separável cuja solução é prontamente obtida por integração em $[S]$ e no tempo. É preciso salientar que as equações que serão apresentadas (3.14 e 3.15) são expressões simplificadas que desconsideram inibições pelo produto e desnaturação enzimática.

A Equação (3.13) demonstra um passo anterior à solução final do processo de integração, quando as variáveis em questão encontram-se separadas. A Equação (3.14) é a expressão algébrica resultante da integração. Observa-se que a mesma é implícita em $[S]$, porém explícita na variável t . Neste sentido, os perfis de concentração de 5-CQA em função do tempo que serão apresentados no capítulo 4 (seção 4.2) serão obtidos a partir do cálculo do tempo após serem atribuídos valores de $[S]$ desde $[S]_0$ até uma determinada concentração que gere valores de tempo compatíveis aos valores máximos empregados nos ensaios.

$$v_{max} \int_o^t dt = -K_m \left\{ \int_{[S]_o}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]} \right\} - \frac{[S]}{[S]_o} d[S] \quad (3.13)$$

$$t = \frac{-K_m \ln\{[S]/[S]_o\} - \{[S] - [S]_o\}}{v_{max}} \quad (3.14)$$

A variação de concentração de 5-CQA em função do tempo para diferentes temperaturas pode ser calculada simplesmente considerando-se a correlação entre v_{max} e T representada pela Equação (2.5) ou (3.2).

$$t = \frac{-K_m \ln\{[S]/[S]_o\} - \{[S] - [S]_o\}}{\alpha A_o' \exp\left[\frac{-E_a}{R(T + 273)}\right]} \quad (3.15)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, o efeito do pH sobre a atividade enzimática das PPO será apresentado preliminarmente aos resultados referentes à cinética de oxidação enzimática do 5-CQA. Em particular, no que se refere à esta questão, convém recordar que o objetivo é investigar o efeito da concentração de substrato e da temperatura sobre a velocidade de reação.

4.1. Atividade Enzimática em Diferentes pH's e Coeficiente de Absortividade Molar do 5-CQA

A Figura 4.1 apresenta a atividade enzimática relativa das PPO em diferentes valores de pH's envolvendo soluções do tampão citrato(50 mM)-fosfato(0,1 M). Observa-se que na faixa de pH investigada a atividade máxima é obtida em pH aproximadamente igual a 7,0. Este resultado está em acordo com os valores de pH's ótimos determinados em estudos similares de oxidação de 5-CQA com PPO apresentados na literatura (GOETGHEBEUR e KERMASHA, 1996; MELO, 2005; NEVES, 2007; MUNÕZ *et al.*, 2007) e reportados na Tabela 2.3.

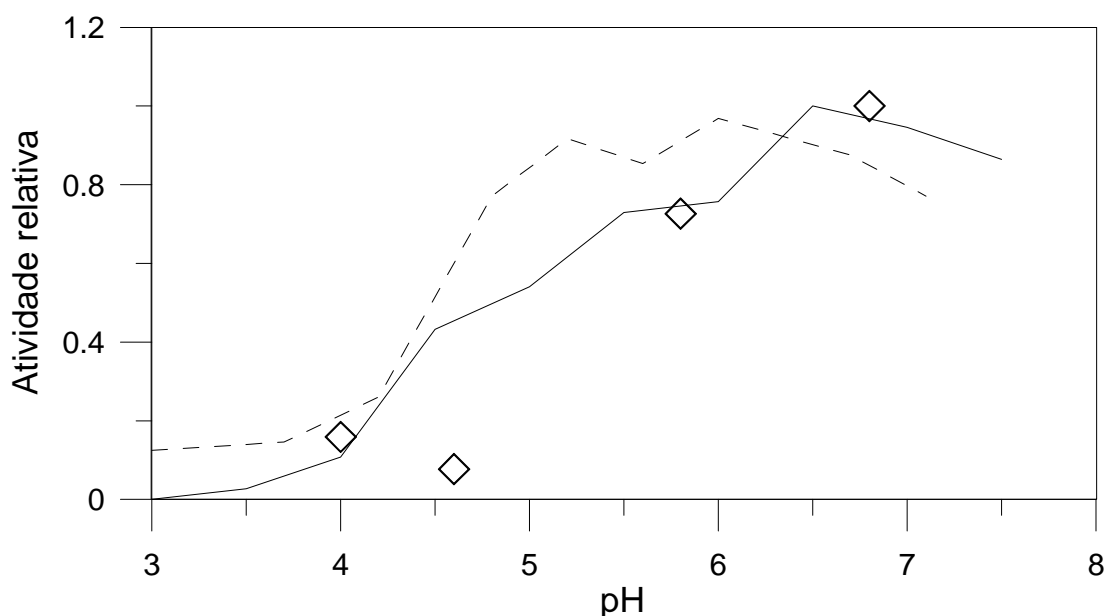


Figura 4.2- Uma comparação da atividade enzimática relativa da PPO utilizada nesta investigação (símbolos) com resultados da literatura (linhas). Linha contínua: SÉLLES-MARCHART *et al.*, (2006); Linha tracejada: FARIA *et al.*, (2007).

A variação da atividade enzimática com o pH é outro aspecto importante a ser notado na Figura 4.1. Os resultados obtidos nesta investigação reproduzem evidências experimentais disponíveis na literatura (SÉLLES-MARCHART *et al.*, 2006; FARIA *et al.*, 2007), o que corrobora os procedimentos experimentais e materiais utilizados neste trabalho. O decréscimo da atividade enzimática com a redução do pH também evidencia a baixa atividade enzimática em meio ácido ($\text{pH} < 4,0$). Este fato tem sido amplamente reportado na literatura (FARIA *et al.*, 2007; ARAÚJO, 1995, MARTINEZ e DUVNJAK, 2006), principalmente com o propósito de interromper reações enzimáticas para efeito de posterior análise de alíquotas retiradas do reator em estudos cinéticos.

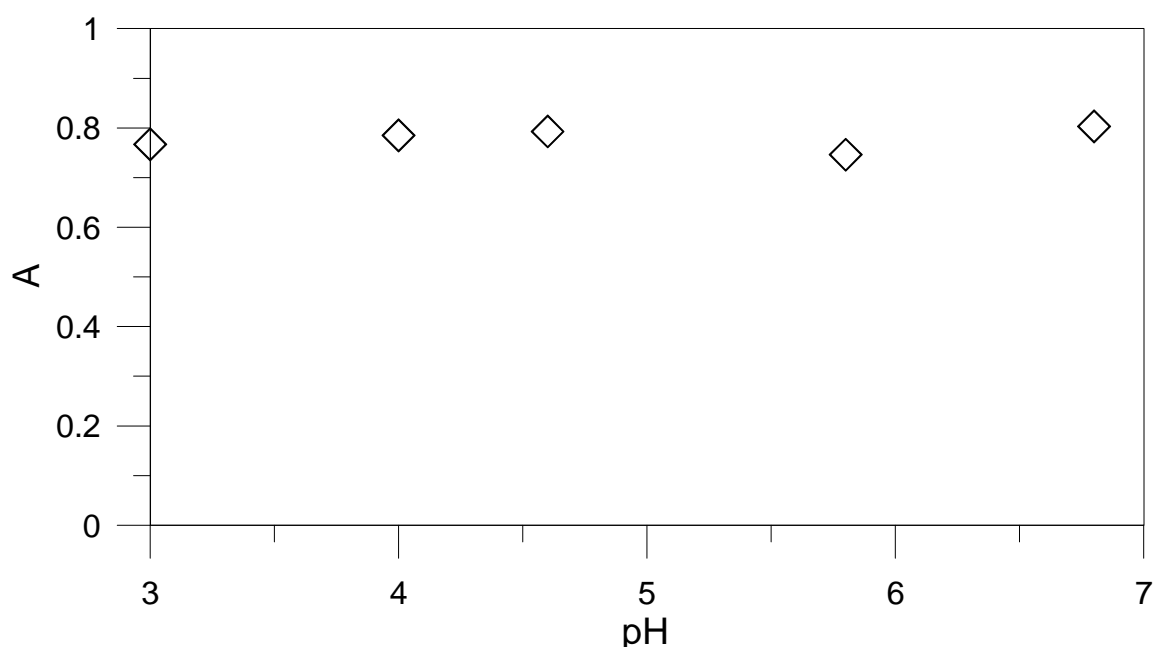


Figura 4.3 - Efeito do pH sobre a absorvância de uma solução de 5-CQA ($0,02 \text{ mg ml}^{-1}$) na ausência de enzimas em tampão *citrato-fosfato*.

No capítulo 3 (seção 3.1) havia sido mencionada a observação de modificação de cor da solução de 5-CQA em contato com tampão fosfato em concentrações iniciais de 5-CQA próximas às desejadas nos ensaios cinéticos, enquanto que nada havia sido constatado neste sentido ao empregar-se o tampão *citrato-fosfato*. De fato, na faixa de concentrações utilizadas nos ensaios cinéticos reportados nas Tabelas 3.1 e 3.2 ($0,016$ - $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) não ocorreram interferências nos experimentos, como demonstrado na Figura 4.2, por exemplo. Basicamente, esta figura reporta os valores constantes de absorvância obtidos ao monitorar

uma solução de 5-CQA, na concentração de $0,02 \text{ mg ml}^{-1}$, em diferentes pH's. Como já explicado, esta evidência era fundamental para investigação da atividade enzimática em diferentes pH's.

Ainda em relação a esta questão, convém esclarecer que uma coloração amarelada, acompanhada de variação na absorbância da solução, foi observada para concentrações de 5-CQA maiores que $0,7 \text{ mg ml}^{-1}$ ao utilizar-se tampão *citrato-fosfato*. Este fato limitou a escolha de maiores concentrações de substrato nos ensaios cinéticos, como evidenciado nas Tabelas 3.1 e 3.2, sugerindo a hipótese que o 5-CQA interage quimicamente com o tampão em concentrações de substratos altas.

A Figura 4.3 apresenta os dados de concentração de 5-CQA em função da absorbância obtidos em um espectrofotômetro (UV 1100, Pró-Análise) a 325 nm. A expressão de Beer-Lambert (Equação 3.1) descreve corretamente o comportamento experimental obtido, o que é comprovado por um coeficiente de determinação (R^2) próximo à unidade.

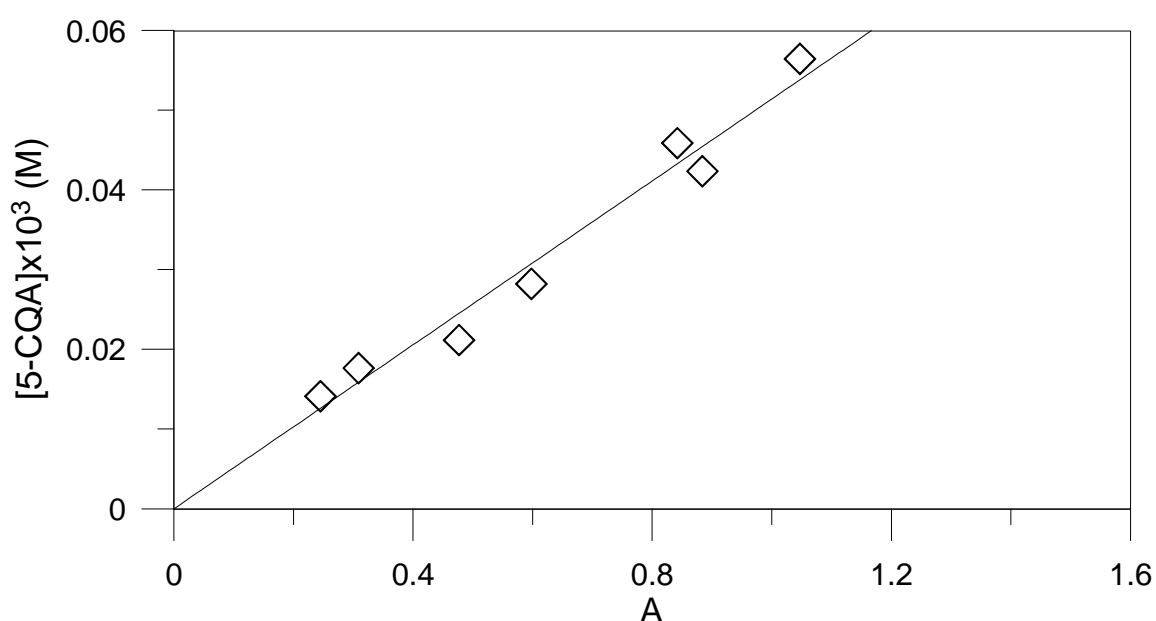


Figura 4.4 - Relação entre a concentração de 5-CQA de soluções padrão e a absorbância a 325 nm.

Visto que a distância percorrida pela luz na cubeta utilizada nas medidas espectrofotométricas era de 1 cm (l), o coeficiente de absorvidade molar do 5-CQA é

prontamente obtido como inverso do coeficiente angular da reta ajustada aos resultados experimentais reportados na Figura 4.3 ($\epsilon=1,95 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 325 nm). Uma comparação entre o coeficiente de absortividade molar para o 5-CQA obtido nesta investigação e um valor análogo reportado na literatura ($\epsilon=1,96 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 330 nm) (TRUGO e MACRAE, 1984) em condições similares de operação, confirma o valor encontrado através do ajuste linear da equação (3.1) na figura 4.3.

4.2. Determinação dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten

A determinação das constantes K_M e v_{max} requer pares ordenados de velocidade inicial de consumo de 5-CQA em função de concentrações iniciais deste substrato. Estes dados serão obtidos a partir da Equação (3.9), porém inicialmente será necessário calcular o conjunto de parâmetros $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$.

Com o propósito de calcular a constante $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$, um polinômio de 2ª ordem e uma função racional representada pela Equação (4.1) foram ajustadas aos dados experimentais de variação de concentração de 5-CQA e de absorbância de o-Q em função do tempo, respectivamente. Os modelos empíricos foram utilizados para estimativa da [5-CQA] e A_{o-Q} em um mesmo tempo de reação e nas mesmas condições experimentais (S1 da Tabela 3.1). Como previsto pela Equação (3.9), a Figura 4.4 evidencia uma relação linear ($R^2=0,96$) entre estas variáveis no início da reação ($t \leq 45 \text{ s}$), sendo que o coeficiente angular desta curva (0,0644 mM) representa o conjunto de parâmetros $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$.

$$A_{o-Q} = \frac{at}{b+t} \quad (4.1)$$

Não existe razão lógica para que ocorra variação do conjunto $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$ em condições cinéticas diferentes das do ensaio S1 da Tabela 3.1, visto o caráter constante dos coeficientes estequiométricos da Reação (3.5) e do coeficiente de absortividade molar das o-Q (ϵ_{o-Q}) a 400 nm. Neste sentido, o valor encontrado para $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$ pode ser utilizado na Equação (3.9) para estimativa da concentração de 5-CQA em qualquer condição experimental. A variação da inclinação da curva apresentada na Figura 4.4 para tempos superiores a aproximadamente 45 s é atribuída ao mecanismo complexo de oxidação do 5-

CQA, o qual envolve etapas sequenciais de reação, como sugerido no capítulo 2 (seção 2.5). De fato, este resultado corrobora a natureza instável das quinonas e *o*-Q reportado na literatura (FENOLL; *et al.*, 2001; FARIA *et al.*, 2007).

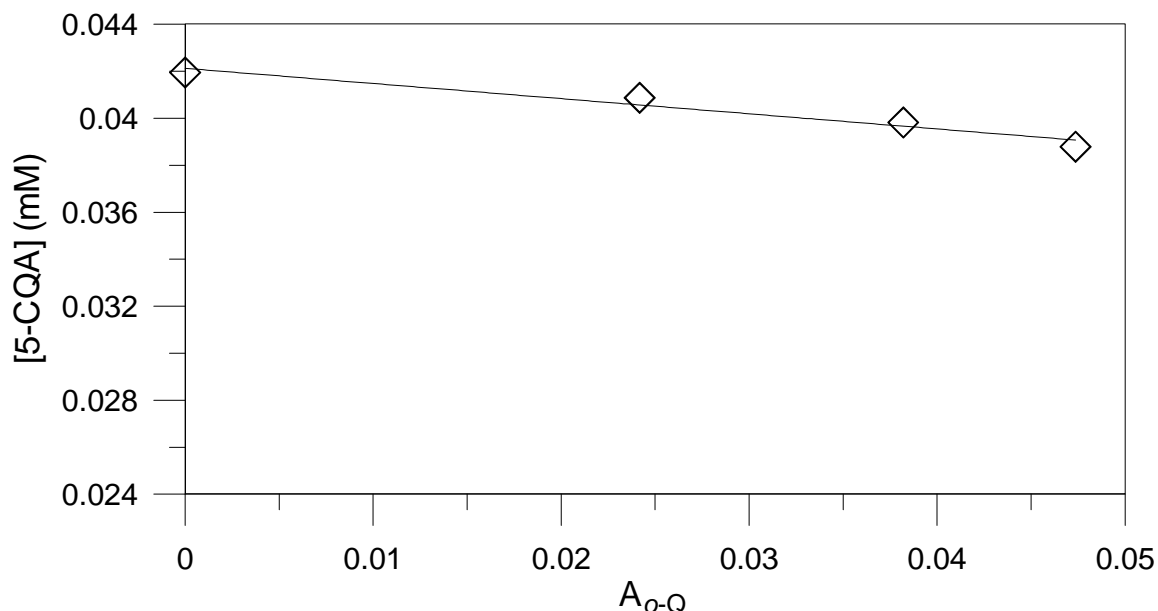


Figura 4.5 - Relação entre a concentração de 5-CQA e a absorbância das *o*-Q para estimativa de $\beta/\gamma\epsilon_{o-Q}$ da Equação (3.14).

As absorbâncias dos produtos (A_{o-Q}) em diferentes tempos de reação, as quais são reportadas nas Figuras 4.5 a 4.7, foram substituídas na Equação (3.9) para estimativas da variação temporal das concentrações de substrato. A inclinação da curva obtida nos instantes iniciais de reação representa a velocidade inicial de consumo de 5-CQA.

Em seguida, os dados de velocidade inicial em função das concentrações iniciais de substrato obtidos pela Equação (3.9) são apresentados na Figura 4.8d. Os mesmos foram utilizados para estimativa dos parâmetros da Equação de Michaelis-Menten através de regressão não linear e também envolvendo os diferentes métodos de linearização apresentados no capítulo anterior. A Tabela 4.1 apresenta os valores numéricos de K_M e v_{max} obtidos através destas diferentes metodologias.

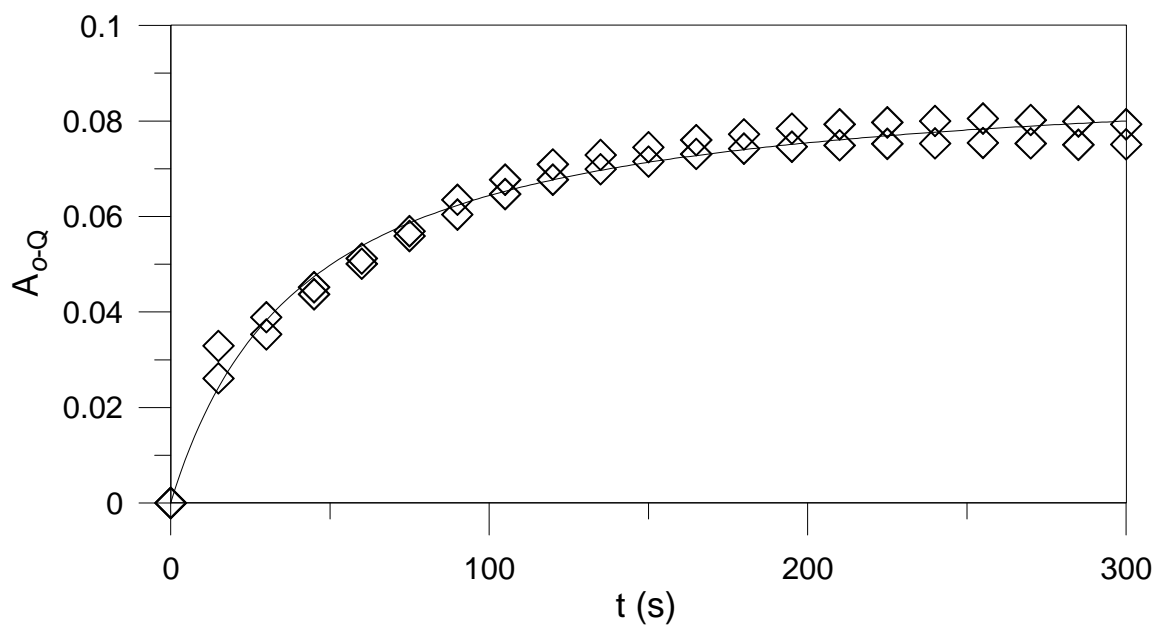


Figura 4.6 - Absorbância dos produtos a 400 nm a $[5\text{-CQA}]_o = 0,045\text{mM}$ (ensaio S1 da Tabela 3.1). Linha contínua=Equação (4.1).

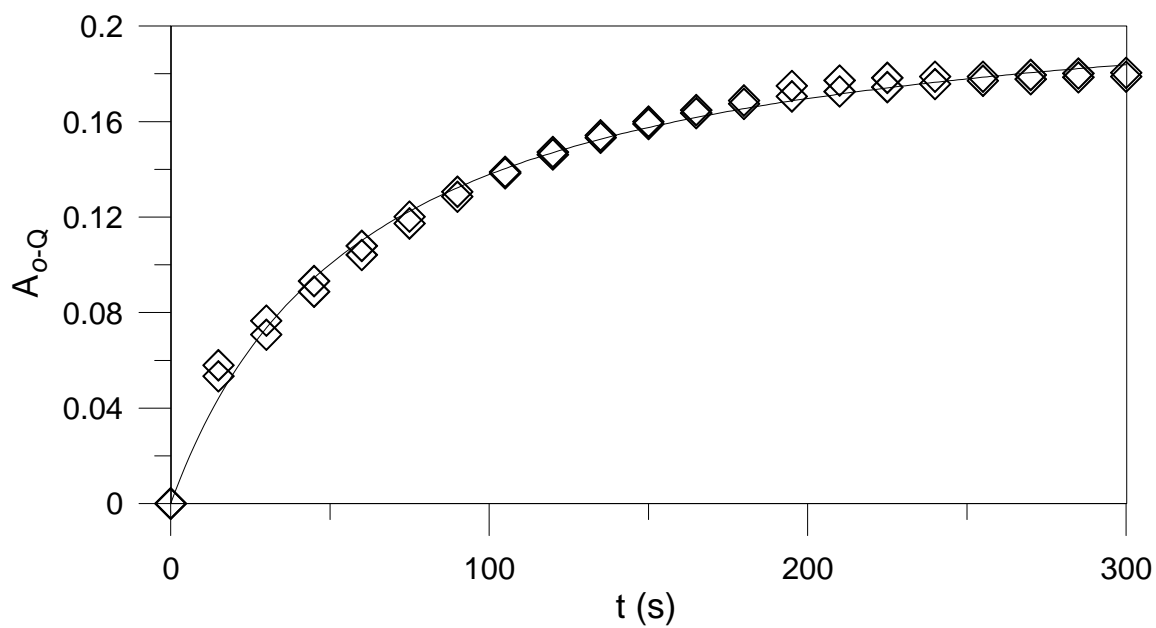


Figura 4.7 - Absorbância dos produtos a 400 nm a $[5\text{-CQA}]_o = 0,706\text{ mM}$ (ensaio S2 da Tabela 3.1). Linha contínua=Equação (4.1).

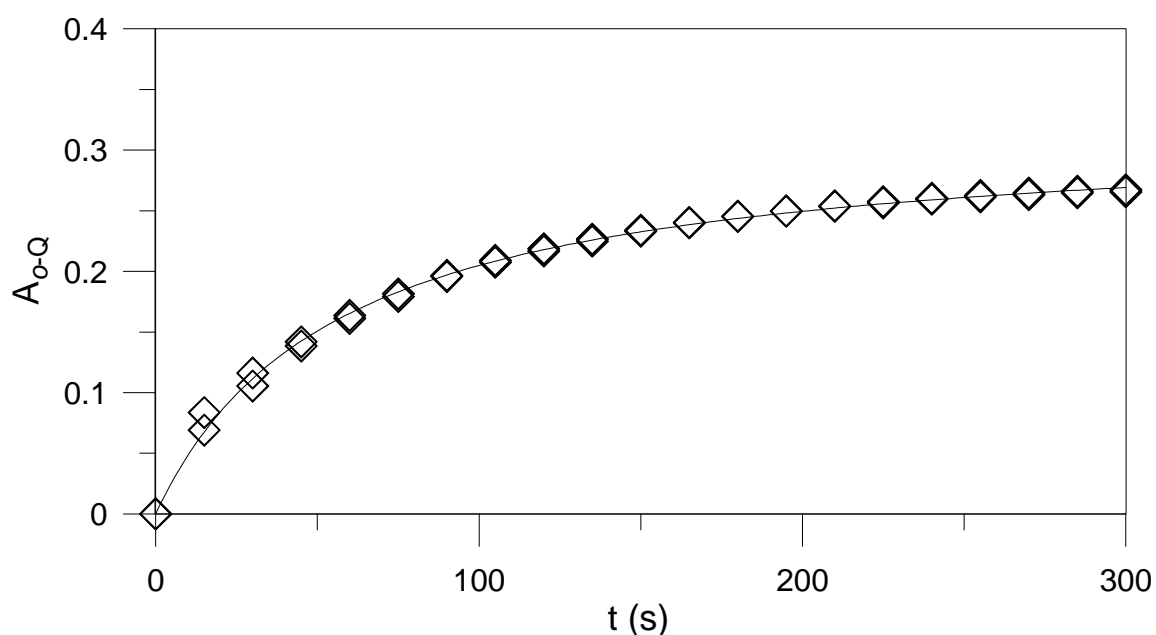


Figura 4.8 - Absorvância dos produtos a 400 nm a $[5\text{-CQA}]_0 = 1,411 \text{ mM}$ (ensaio S3 da Tabela 3.1). Linha contínua=Equação (4.1).

Tabela 4.1 - Parâmetros do modelo de Michaelis-Menten ajustados de acordo com diferentes métodos.

Método	R^2	K_M (mM)	v_{max} (mM s ⁻¹)
Lineweaver-Burk	0,95	0,078	$1,66 \times 10^{-4}$
Eadie-Hofstee	0,75	0,113	$1,89 \times 10^{-4}$
Não-Linear	0,91	0,117	$1,83 \times 10^{-4}$
Langmuir (Hanes-Woolf)	0,91	0,240	$2,12 \times 10^{-4}$

Em relação ao parâmetro K_M , determinou-se o valor da média (0,137mM), variância (0,0037665) e desvio padrão (0,061).

A Figura 4.8 apresenta uma representação gráfica dos diferentes procedimentos adotados para estimativa dos parâmetros reportados na Tabela 4.1, os quais têm efeito significativo sobre os valores obtidos. Em função desta questão algumas características dos métodos de linearização serão brevemente discutidas.

O método de Lineweaver-Burk, embora muito conhecido, não é considerado o melhor método de linearização (CORNISH-BOWDEN, 1995). Em geral, sua baixa confiabilidade é atribuída a aglomeração de pontos em determinadas faixas de concentração

inicial de substrato e ao aumento desigual da incerteza experimental envolvida na determinação das concentrações iniciais de substrato. Pelo menos um destes aspectos é claramente observado na Figura 4.8a, a qual evidencia uma distribuição não uniforme de pontos no intervalo de concentrações investigado.

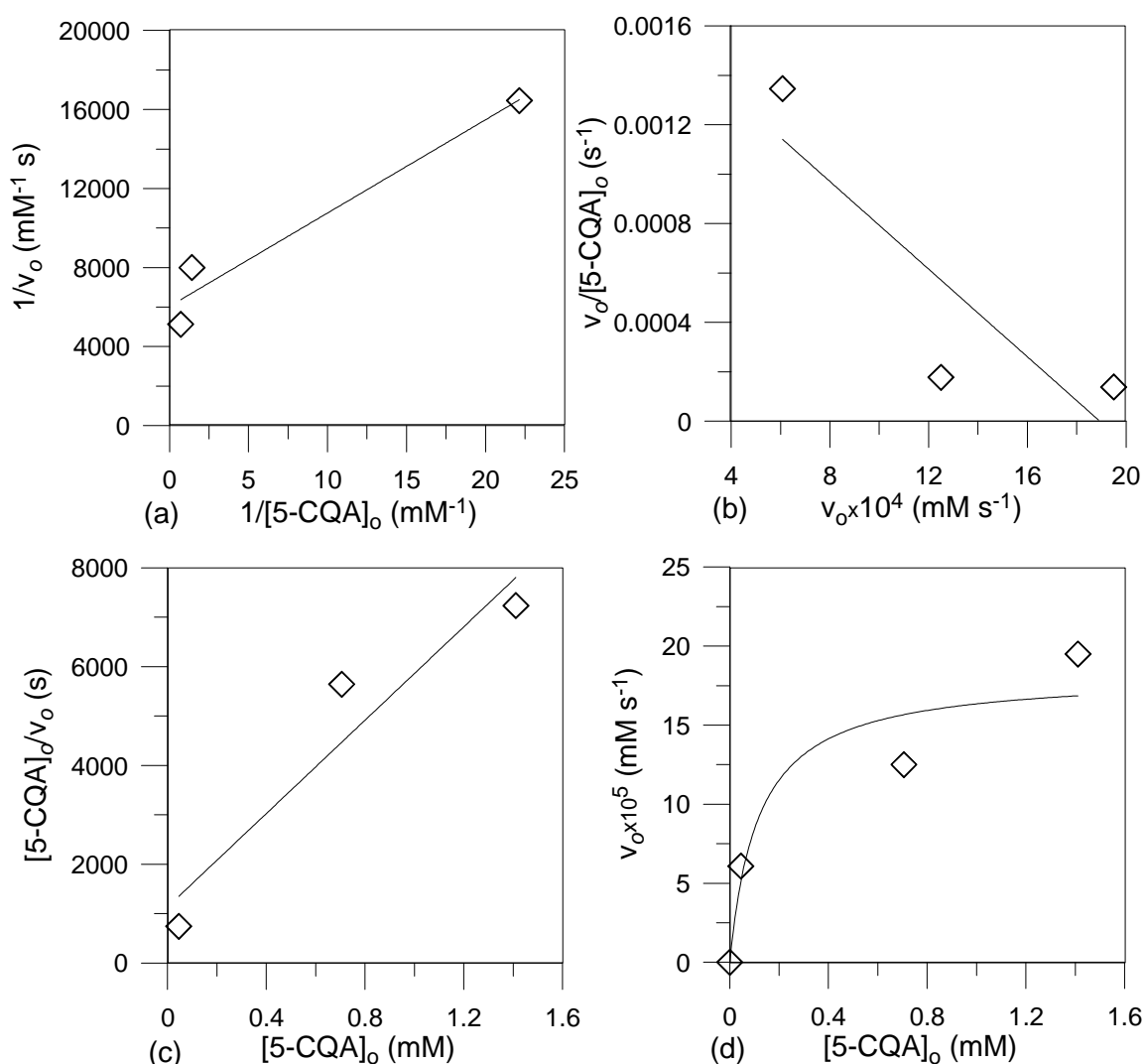


Figura 4.9 -Representação gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk (a); por Eadie-Hofstee (b), por Langmuir (c) e por regressão não-linear (d).

Embora o método de Eadie-Hofstee represente um avanço em relação ao procedimento de Lineweaver-Burk, pois gera uma distribuição mais uniforme de pontos (observar Figura 4.8b), a distorção nos erros experimentais é mantida, todavia não

evidenciada nesta investigação, o que reduz a precisão do método (CORNISH-BOWDEN, 1995).

No gráfico que representa a linearização por Langmuir (Hanes-Woolf) a distribuição dos pontos é espaçada e uniforme. Neste caso, estes pontos não apresentam um peso indevido na regressão linear. Por esta razão, e também por diminuir a propagação de erros devido a incertezas nas medidas das variáveis primárias, o método é extensivamente sugerido na literatura (ex.; MOSER, 1985). O coeficiente de determinação estimado ao aplicar este procedimento de linearização demonstra que o modelo cinético proposto pode descrever aproximadamente 95 % da variação da velocidade inicial de consumo de 5-CQA devido a alterações na concentração inicial do substrato.

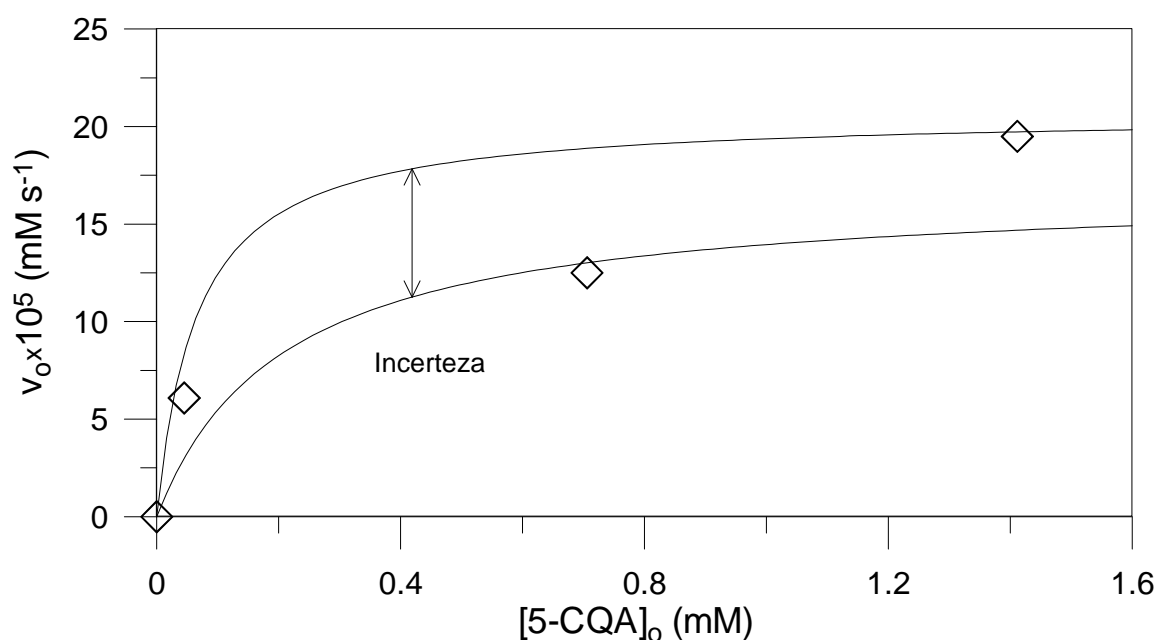


Figura 4.10 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curva) da velocidade de oxidação do 5-CQA em função de sua concentração inicial. Incerteza calculada considerando $K_M = 0,137 \pm 0,071 \text{ mM}$ e $v_{\text{máx}} = 1,875 \times 10^{-4} \pm 0,19 \times 10^{-4} \text{ mM.s}^{-1}$ obtidos por diferentes procedimentos de linearização da Equação de Michaelis-Menten e por ajuste não linear.

Para efeito de comparação dos parâmetros cinéticos com resultados da literatura em condições experimentais análogas (GOETGHEBEUR e KERMASHA, 1996; MELO, 2005; MARTINEZ e DUVNJAK, 2006; NEVES, 2007; MUNÕZ *et al.*, 2007), pelas razões já expostas, os valores obtidos pelo método de linearização de Langmuir (Hanes-woolf) serão

utilizados. De fato, os dados da literatura que estão resumidos na Tabela 2.3 confirmam a validade dos procedimentos experimentais e de cálculo envolvidos na determinação de K_M , pois o valor encontrado nesta investigação (0,24 mM) apresenta a mesma ordem de grandeza destes resultados, os quais variam entre 0,04 e 1,5 mM. Convém recordar que em catálise enzimática, muitas variáveis influenciam a atividade da enzima, tais como a fonte originária da PPO, o tipo de substrato e tampão, a temperatura e o pH. Desta forma, atribuí-se as diferenças residuais entre os valores de K_M encontrados na literatura aos efeitos destes fatores.

A incerteza dos parâmetros apresentadas na Figura 4.9 foi estimada de maneira a considerar os desvios padrões com os dados reportados da Tabela 4.1.

4.3. Determinação dos parâmetros da equação de Arrhenius

Através dos valores das velocidades iniciais de reação, determinadas a partir de resultados de concentração de 5-CQA em função do tempo nas condições dos ensaios T1 a T4 da Tabela 3.1, podem ser encontrados os parâmetros da equação de Arrhenius, os quais são importantes para análise do efeito de temperatura sobre a conversão do substrato.

Os ensaios utilizados na determinação dos parâmetros de Arrhenius foram obtidos em uma concentração de substrato inferior aquela que permite a obtenção da velocidade máxima de reação. Neste sentido, a dependência de v_{max} com a temperatura exige a determinação da constante α da Equação (3.2). Na temperatura de 32 °C, a razão entre a velocidade máxima e a velocidade na $[5-CQA]_0=0,045$ mM considerando a média aritmética de v_{max} da Tabela 4.1 é aproximadamente igual a 3,18.

Na Figura 4.10, é apresentado um diagrama envolvendo o logaritmo natural das velocidades iniciais em função do inverso da temperatura. O fator de frequência ($A'_0=1422$ mM s⁻¹) e a energia de ativação ($E_a=43,1$ KJ/mol) foram ajustados aos resultados reportados nesta figura. As diferenças residuais entre os valores experimentais e estimados pela equação linearizada de Arrhenius corrobora a validade do modelo utilizado para representar o efeito da temperatura sobre as velocidades iniciais de consumo de 5-CQA dos ensaios T1 a T4 da Tabela 3.1.

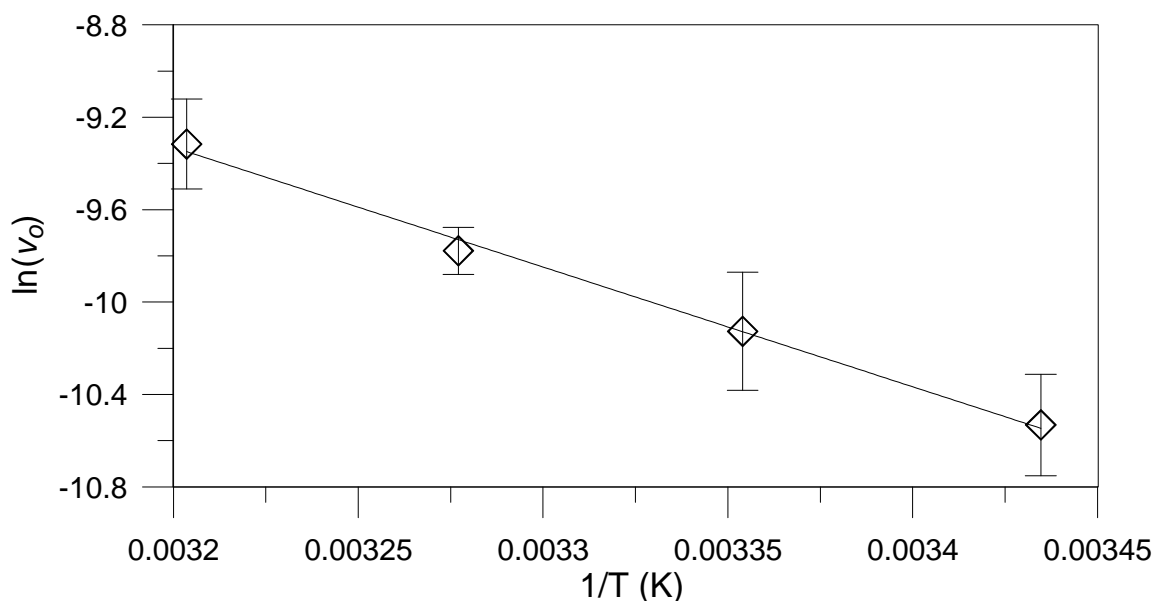


Figura 4.11 - Equação linearizada de Arrhenius para análise do efeito da temperatura sobre a velocidade inicial em $S_0=0,045\text{mM}$. $A'_0=1422\text{ mM s}^{-1}$, $E_a/R=5185$ e $E_a=43,1\text{KJ/mol}$.

4.4 Validação do Modelo

A consistência do modelo cinético será investigada por comparação entre resultados calculados e experimentais de variação de concentração de 5-CQA com o tempo em diferentes temperaturas e concentrações iniciais de 5-CQA. A Equação (4.2), obtida por substituição dos parâmetros cinéticos na Equação (3.15), será utilizada nesta análise.

$$t = \frac{-(0,137) \ln\{[S]/[S]_o\} - \{[S] - [S]_o\}}{(3,18)(1422) \exp\left[\frac{-5185}{(T + 273)}\right]} \quad (4.2)$$

As Figuras 4.11 a 4.14 representam os perfis temporais de [5-CQA] obtidos nas condições dos ensaios T1 a T4 da Tabela 3.1. Essencialmente a diferença entre as curvas é atribuída a influência da temperatura, a qual variou entre 18 e 39 °C. Em cada figura são apresentados dois perfis obtidos em condições experimentais idênticas, os quais representam réplicas dos ensaios.

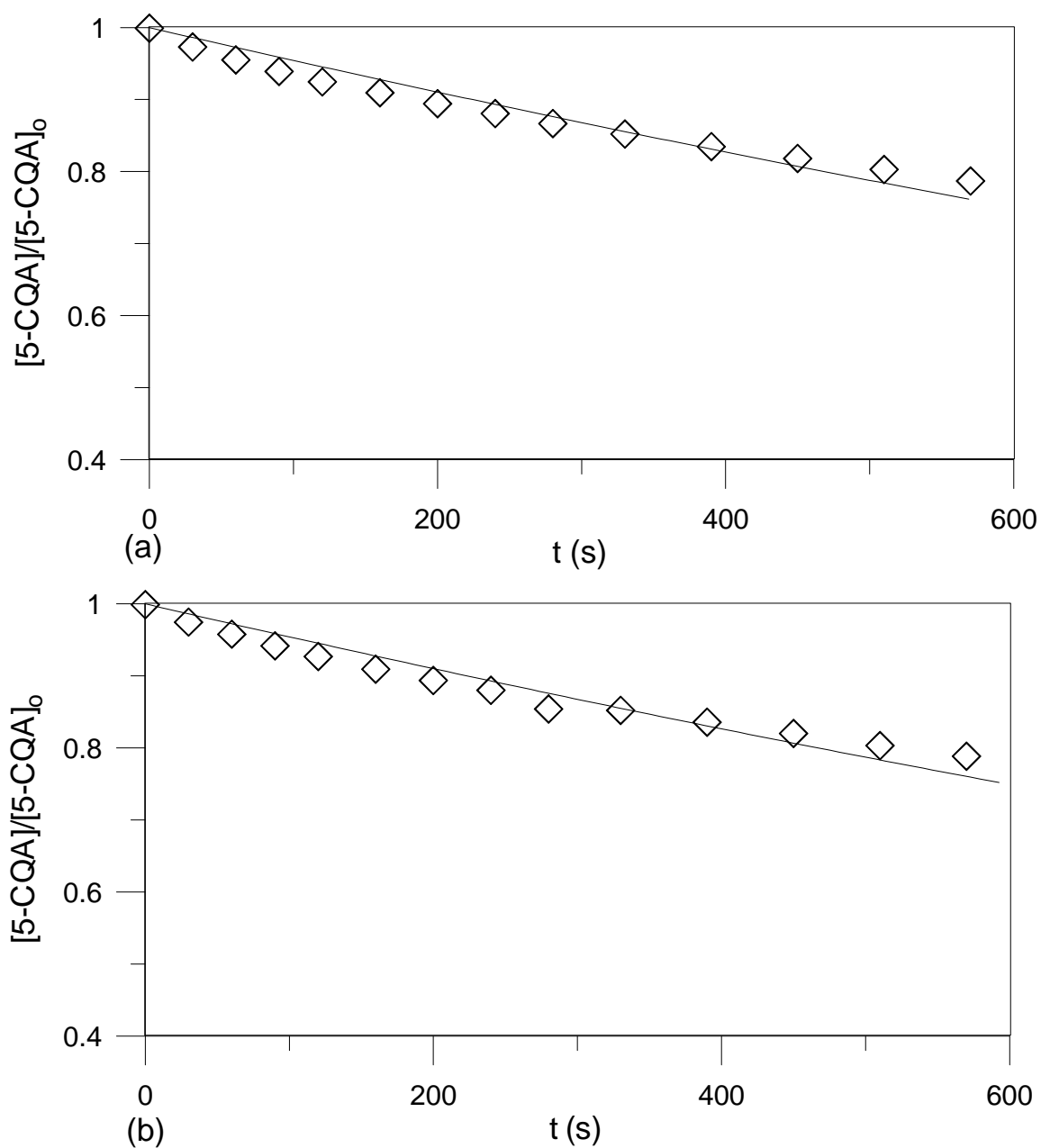


Figura 4.12 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curvas) da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação a $T=18^{\circ}\text{C}$ com $S_0=0,045$ mM.

A comparação entre resultados calculados e experimentais em todos os casos reportados nas Figuras 4.11 a 4.14 demonstra que o efeito da temperatura sobre a velocidade máxima de reação foi estimado corretamente. A diferença residual pode ser atribuída a alguma reação paralela ou sequencial que no início da reação é desprezível, tais como desnaturação enzimática ou inibição pelo produto, por exemplo.

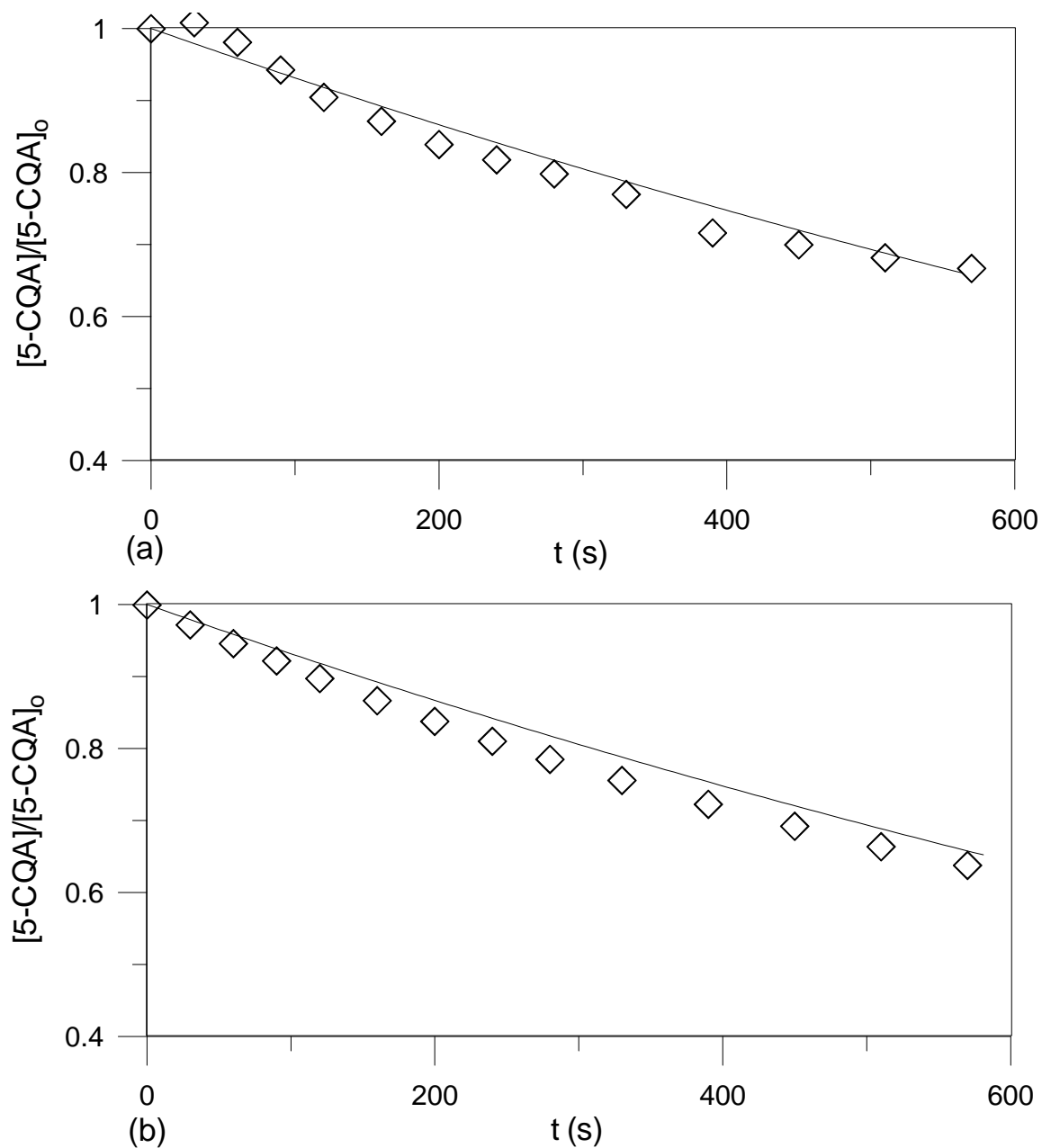


Figura 4.13 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curvas) da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação à $T=25^{\circ}\text{C}$ com $S_0=0,045\text{ mM}$.

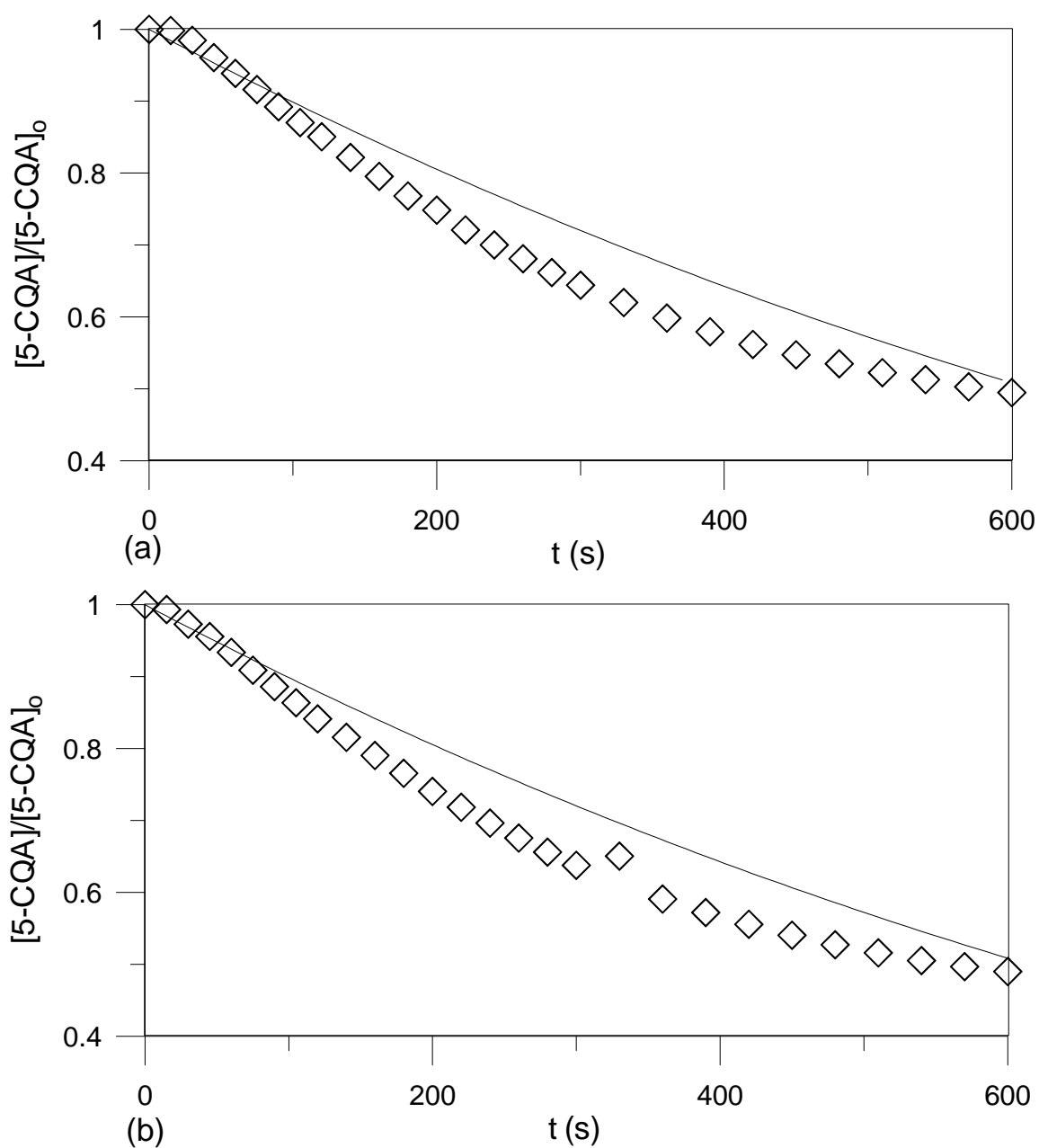


Figura 4.14 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curvas) da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação a $T=32\text{ }^{\circ}\text{C}$ com $S_o=0,045\text{ mM}$.

Ainda em relação às Figuras 4.11 a 4.14, observa-se que os desvios se acentuam à temperaturas mais altas, principalmente após transcorridos aproximadamente 100 s de reação. Além da desnaturação enzimática, a qual é acelerada com o aumento da temperatura, este comportamento pode ser causado pela falta de oxigênio no meio reacional, cujo efeito foi negligenciado no modelo proposto. À medida que a temperatura

aumenta, a concentração de oxigênio dissolvido tende a ser reduzida, e desta forma limita a ação da enzima. Este aspecto foi discutido por MUÑOZ *et al.*, (2007).

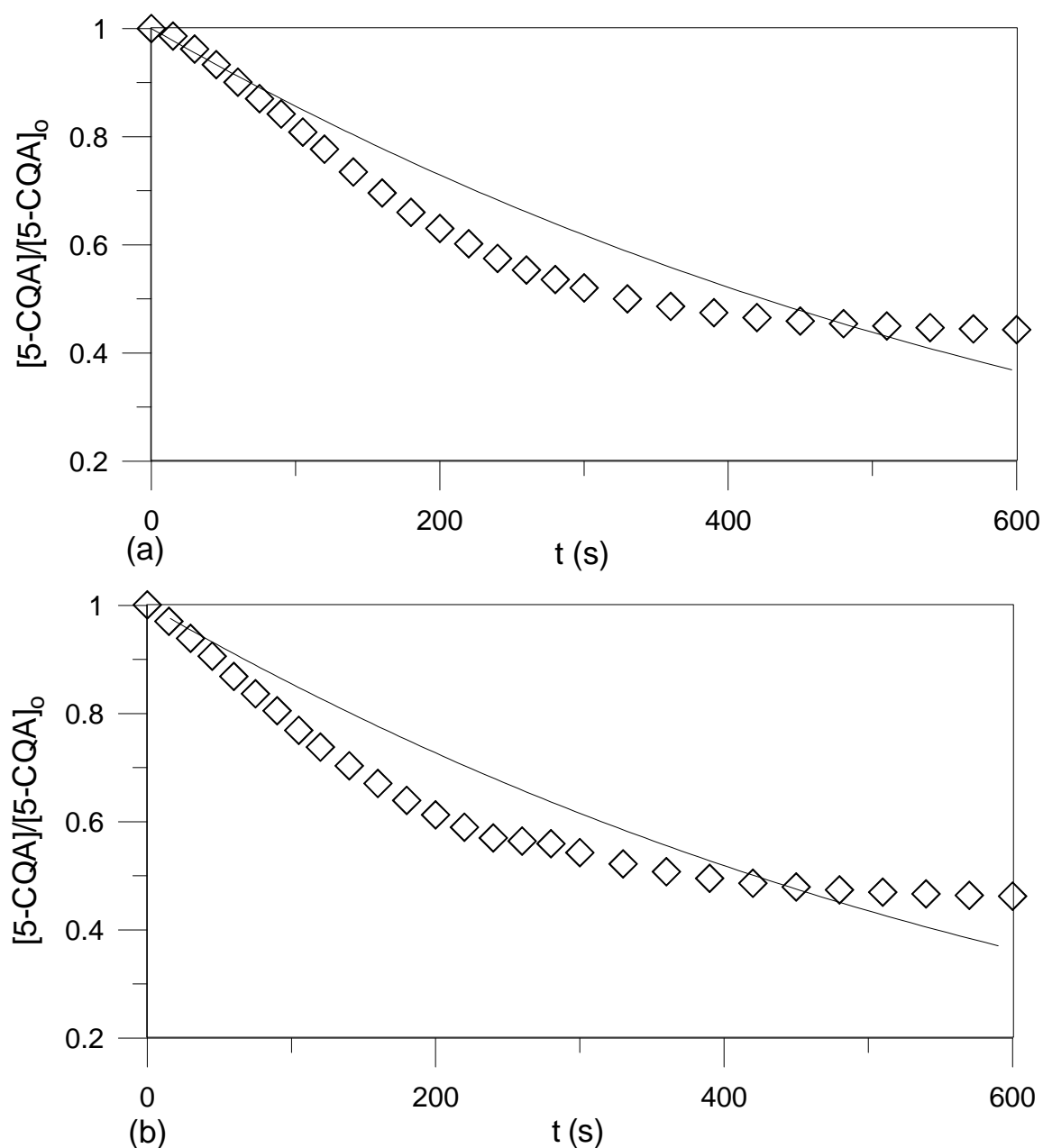


Figura 4.15 - Variação experimental (símbolos) e calculada (curvas) da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação a $T=39\text{ }^{\circ}\text{C}$ com $S_o=0,045\text{ mM}$.

Como destacado no Capítulo 3, ensaios adicionais foram realizados em concentrações de substrato e temperaturas diferentes daquelas utilizadas para determinação

dos parâmetros definidos na Equação (4.2). Estas condições experimentais são reportadas na Tabela 3.2. O procedimento experimental para obtenção dos perfis de concentração envolvia amostragem de alíquotas do meio reacional, com conseqüente interrupção da reação, congelamento, diluição e leitura. Esta metodologia, além de ser maior trabalhosa, aumenta significativamente as incertezas nas medidas de concentração de 5-CQA, como evidenciado nos desvios padrões reportados nas Figuras 4.15 e 4.16.

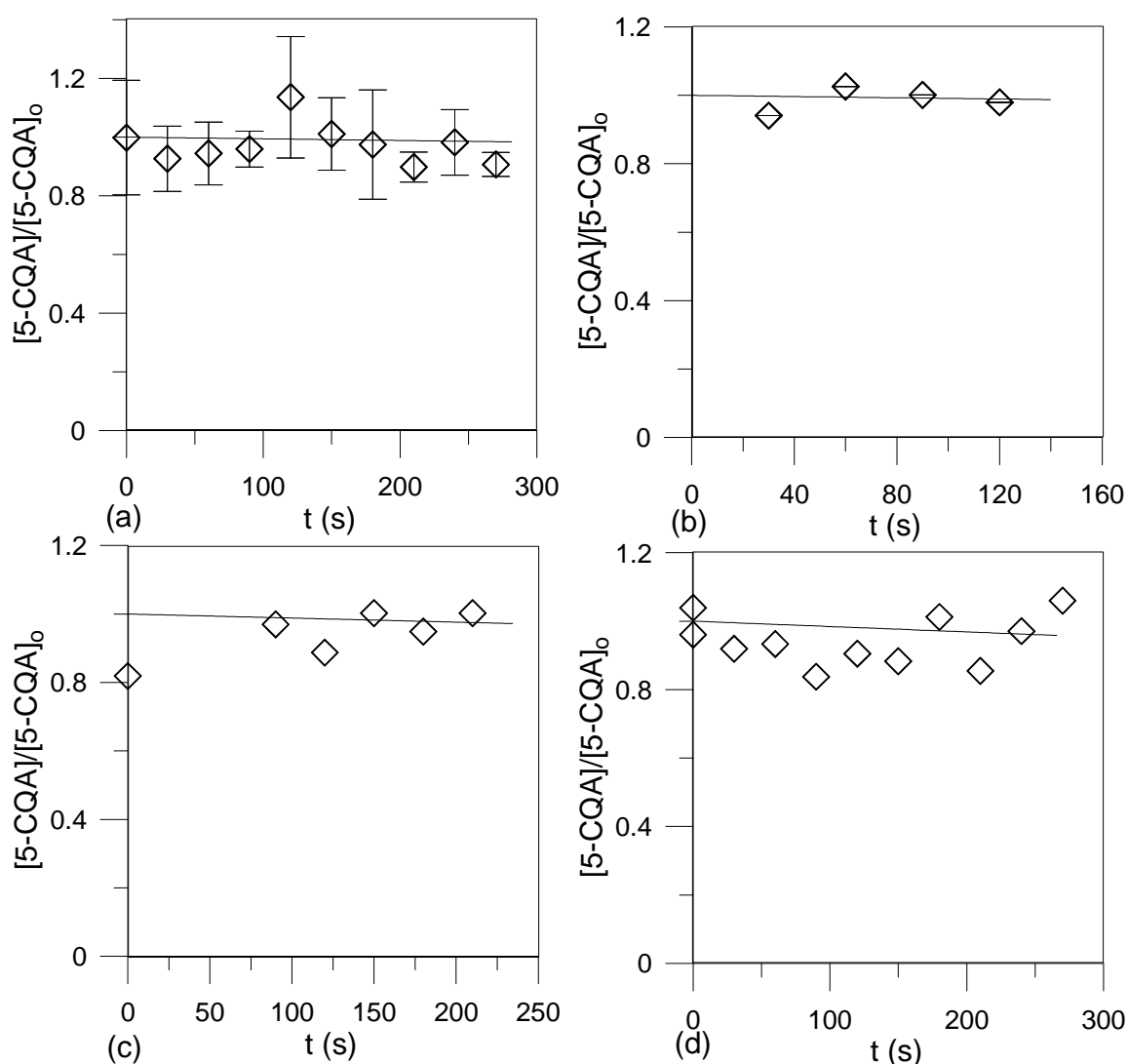


Figura 4.16 - Concentrações experimentais (símbolos) e calculadas (curvas) de 5-CQA em função do tempo de reação nas temperaturas de 20 °C (a), 27 °C (b), 32 °C (c) e 39 °C (d), e $S_0=0,169$ mM.

Apesar das incertezas dos resultados dos ensaios V1 a V6 da Tabela 3.2, estes dados são importantes para corroborar o modelo cinético visto que foram obtidos de forma completamente independente das curvas utilizadas para ajuste dos parâmetros cinéticos. Em geral observam-se pequenos decréscimos na medida da concentração de 5-CQA, o que é atribuído à concentração reduzida de enzimas utilizadas nos ensaios. De qualquer forma, este comportamento é descrito corretamente pelo modelo cinético em todas as condições investigadas.

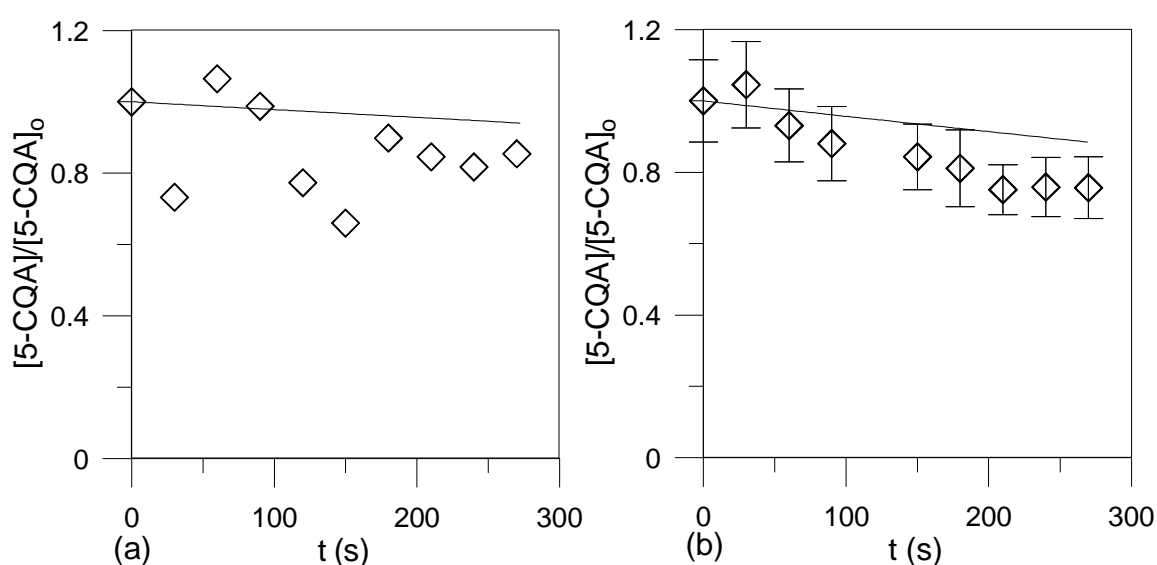


Figura 4.17 - Concentrações experimentais (símbolos) e calculadas (curvas) de 5-CQA em função do tempo de reação nas temperaturas de 27 °C (a) e 39 °C (b) e $S_0=0,0564$ mM.

4.5. Simulação da degradação do 5-CQA e do CGA total durante o armazenamento da erva-mate.

Nesta seção, a oxidação do composto investigado presente na erva-mate será estudada de forma simplificada. Em um primeiro caso o efeito da concentração de enzima não será considerado e as simulações serão realizadas admitindo que a atividade de PPO presente na erva-mate submetida à estocagem é igual à utilizada nos ensaios cinéticos desta investigação. Na segunda situação, a influência da concentração de enzima será admitida na expressão algébrica (Equação 4.2) utilizada para os cálculos.

As concentrações iniciais de substrato utilizadas nestas simulações foram previamente definidas e representam condições tipicamente encontradas na erva-mate *in*

natura. Entretanto, para estimativa destas concentrações em unidades compatíveis as empregadas na Equação (4.2) assumiu-se simplificadamente que o volume reacional é igual ao volume da erva. A Equação (4.3) demonstra a transformação de fração mássica de 5-CQA na erva-mate ($X_{5-CQA}=0,003$ a $0,033 \text{ g g}^{-1}$) para concentração de 5-CQA em *mM*, sendo que a densidade da erva seca ($\rho_{es}=750 \text{ g l}^{-1}$) foi obtida da literatura (Zanoelo *et al.*, 2009). Admitiu-se também que a temperatura durante a etapa de armazenamento/estocagem da erva-mate seria de aproximadamente 25°C .

$$[S]_o = \frac{X_{5-CQA}(\rho_{es})1000}{PM} \quad (4.3)$$

A Figura 4.17 apresenta a concentração adimensional de 5-CQA nas condições do primeiro caso, ou seja, quando a concentração de enzimas (atividade enzimática) na erva-mate estocada foi grosseiramente admitida igual a dos ensaios cinéticos. Observa-se que conversões de 100 % são obtidas em períodos de estocagem inferiores à 1 dia, ou no caso de altas concentrações iniciais de 5-CQA, em no máximo 7 dias.

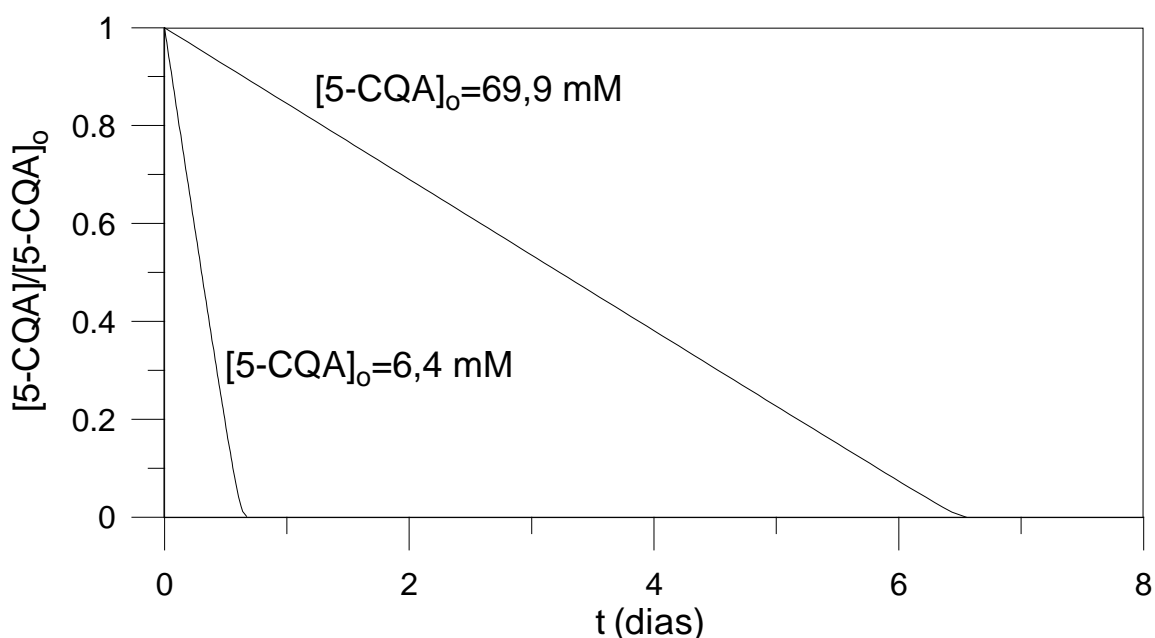


Figura 4.18 - Perfis de concentração adimensional de 5-CQA na erva-mate estocada a $T=25^\circ\text{C}$ e concentrações de substrato definidas pela Equação (4.3).

A fim de que a concentração de enzimas presente na erva-mate estocada possa ser considerada nas simulações é necessário inicialmente calcular o parâmetro k_{cat} , definido pela Equação (4.4). Neste cálculo a concentração de enzimas utilizada nos experimentos cinéticos foi estimada em unidades de atividade por volume reacional, empregando a velocidade máxima da reação ($At=0,01125 \text{ U ml}^{-1}$).

$$k_{cat} = \frac{3,18(1422)}{At} \exp\left(\frac{-5185}{T + 273}\right) \quad (4.4)$$

A velocidade máxima pode então ser reescrita em função da concentração de enzimas na erva-mate (At_{erva}), visto que velocidade máxima representa o produto de k_{cat} pela concentração de enzimas ativas (Equação 4.5).

$$v_{max} = k_{cat} At_{erva} = \frac{3,18(1422) At_{erva}}{At} \exp\left(\frac{-5185}{T + 273}\right) \quad (4.5)$$

A atividade enzimática da erva-mate *in natura* é aproximadamente 1056 U por ml de extrato bruto de erva, em condições cinéticas ótimas (Ceni, 2005). Porém, este valor necessita ser corrigido a fim de que ambas as atividades reportadas na expressão anterior apresentem as mesmas unidades. Esta correção é feita de acordo com a Equação (4.6), onde Ve é o volume de extrato (60 ml), m_{erva} é a massa de erva (40 g) e ρ_{eM} é a densidade da erva-mate *in natura* (882 g. l⁻¹) (Zanoelo *et al.*, 2009).

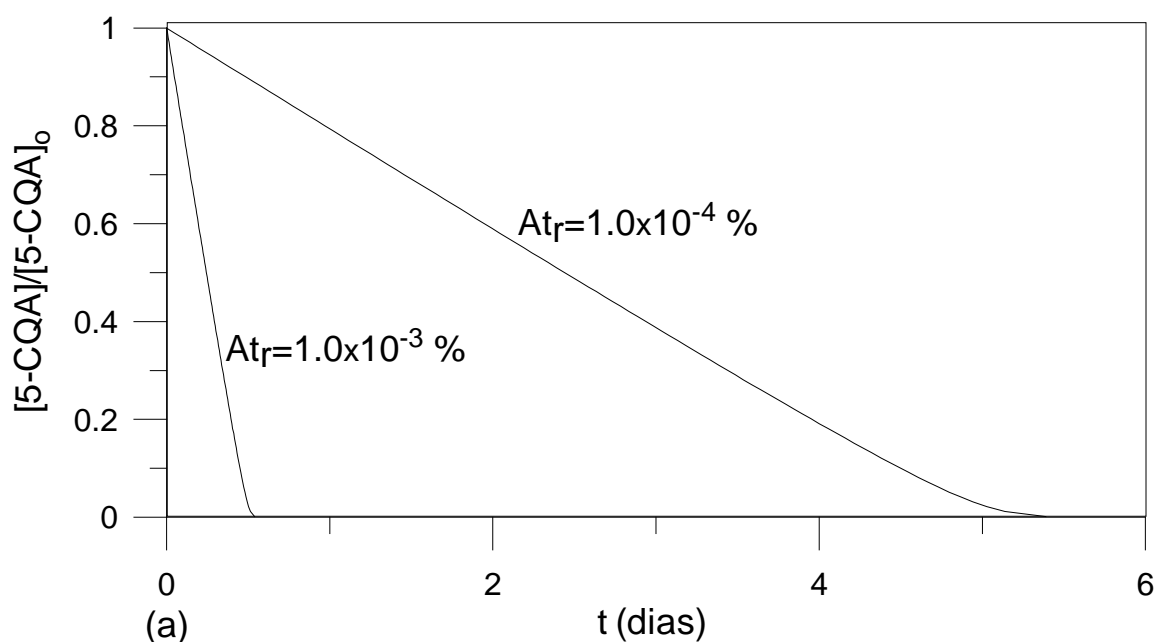
$$At_{erva} = \frac{1056(Ve)\rho_{eM}}{1000m_{erva}} \quad (4.6)$$

É preciso recordar que a atividade estimada pela expressão acima (1397 U por ml de erva) é referente à erva-mate *in natura*, porém a mesma é posteriormente submetida a um procedimento de desnaturação enzimática e secagem em temperaturas altas, de modo que na erva-mate estocada somente atividades residuais serão encontradas.

Finalmente, a Equação (4.7) representa a expressão algébrica necessária à estimativa da oxidação de 5-CQA durante a estocagem de erva. Esta expressão é análoga a Equação (4.2), utilizada na geração dos resultados apresentados na Figura 4.17, porém a mesma considera a concentração de enzimas presente na erva-mate e a atividade residual (At_r , %) após submissão às etapas de desativação e secagem.

$$t = \frac{-(0,137) \ln\{[S]/[S]_o\} - \{[S] - [S]_o\}}{\frac{3,18(1422)(At_r/100)1397}{0,01125} \exp\left(\frac{-5185}{T+273}\right)} \quad (4.7)$$

A Figura 4.18 apresenta a oxidação de 5-CQA na erva-mate estocada à temperatura de 25 °C. Observa-se que mesmo atividades residuais mínimas, da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} % do valor inicial, apresentam efeito significativo se considerados os longos períodos de estocagem a que a erva-mate é tipicamente submetida. Estes dados evidenciam que é equivocado deduzir inexistência de oxidação enzimática da erva-mate durante o armazenamento, com a justificativa de que a atividade enzimática é zero. De fato, o escurecimento da erva nitidamente observado durante a estocagem indica atividade residual relevante, embora baixas a ponto de não poderem ser quantificadas por técnicas convencionais.



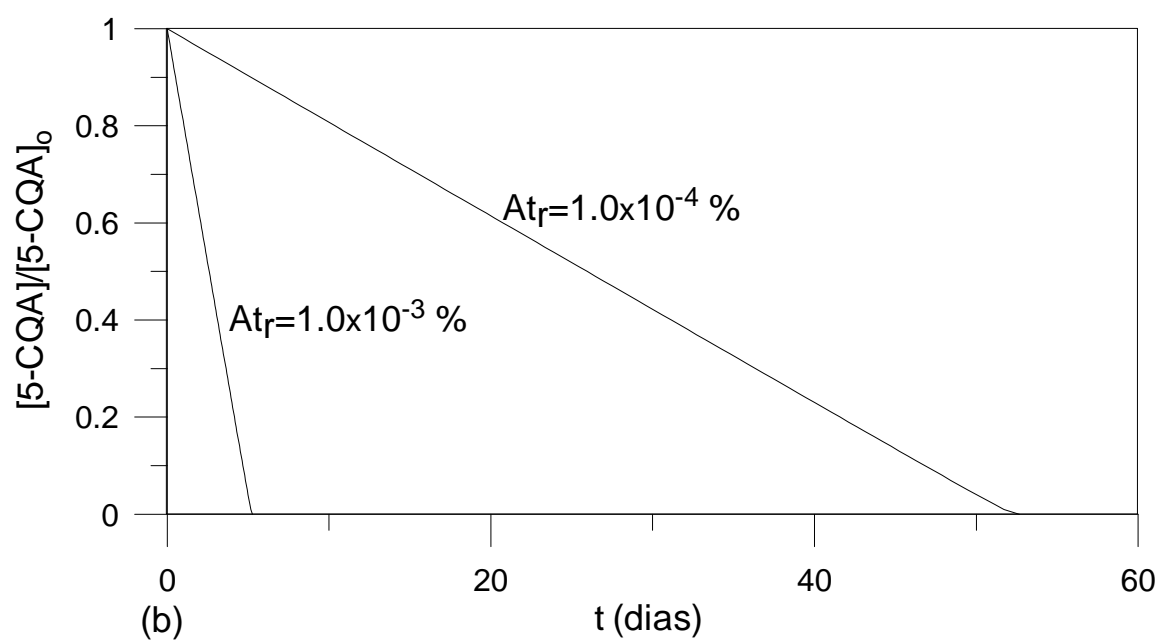


Figura 4.19 - Concentração adimensional de 5-CQA na erva-mate estocada a $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e concentrações de substrato iniciais iguais a 6,4 mM (a) e 69,9 mM (b).

5. CONCLUSÃO

Ensaio experimentais foram realizados para estudo da oxidação enzimática do 5-CQA com polifenoloxidasas em concentrações de substrato variando entre 0,04 a 1,5 mM e a temperaturas de 18 a 40 °C. Medidas *on-line* de absorbância foram realizadas com espectrofotômetro para obtenção de dados de concentração de 5-CQA em função dos fatores investigados.

Os resultados experimentais demonstraram atividade ótima da enzima em pH próximo ao neutro, como de fato evidenciado na literatura. A variação da atividade relativa com o pH também apresentou concordância com resultados obtidos em condições análogas as adotadas nesta investigação.

Um modelo cinético simplificado, obtido por integração e ajuste dos parâmetros da expressão de Michaelis-Mentem, reproduziu o consumo de 5-CQA em todas as condições cinéticas investigadas. A validade do modelo foi verificada por comparação entre resultados calculados e experimentais obtidos em condições distintas das empregadas na determinação dos parâmetros cinéticos.

Uma vez conhecidas as concentrações de 5-CQA na erva-mate e estimada a concentração de enzimas ativas após a desativação enzimática e secagem, o modelo foi empregado para estimativa da oxidação de 5-CQA em condições de tempo e temperatura próximas às encontradas durante a estocagem de erva-mate. Os resultados obtidos indicaram altos níveis de consumo de 5-CQA devido a ação enzimática das PPO nesta etapa do processamento do produto.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS E SUGESTÕES

Algumas sugestões são apresentadas para dar continuidade aos estudos que envolvem a preservação dos componentes medicinais da erva-mate:

- Estabelecer uma relação entre a degradação química e enzimática dos CGA.
- Propor novas metodologias de desativação enzimática e quantificar os CGA no período de estocagem, determinando desta forma qual método mantém o maior percentual de CGA;
- Acompanhar a cinética de degradação no período de armazenamento da erva-mate através da retirada de amostras e quantificação dos CGA.

7. REFERÊNCIAS

- ABITANTE A.L. **Modelagem dinâmica e análise de um sistema de controle de umidade de folhas de erva-mate em secadores contínuos de esteira**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- ANESINI C.; FERRARO G.; FILIP R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**; v. 97, p. 459-464, 2006.
- ARAÚJO, M.A. **Química de alimentos. Teoria e prática**. Imprensa Universitária de Universidade Federal de Viçosa, p. 247, 1995.
- BASTOS, D.H.M.; FORNARI, A.C.; QUEIROZ, Y.S.; TORRES, E.A.F.S. Bioactive Compounds Content Of Chimarrão Infusions Related To The Moisture Of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) Leaves. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.
- BIXBY, M.; SPIELER L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v. 77, p. 345–358, 2005.
- BOUCHILLOUX, S.; MCMAHILL, P.; MASON, H.S. The multiple forms of mushroom tyrosinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.238, n. 5, 1963.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Review**, v. 6, p. 317-333, 1998.
- BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007.
- CENI, G. **Oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hill): extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas**; Dissertação de Mestrado; Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, 2005.
- CARDOZO JR., E.L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M.L.L.; DONADUZZI C.M.; STURION, J.A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 553-558, 2007.
- CHEYNIER, V; MOUTOUNET M. Oxidative Reactions of Caffeic Acid in Model Systems Containing Polyphenol Oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2038-2044, 1992.
- CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R.R. Chlorogenic Acids and Purine Alkaloids Contents of Maté (*Ilex paraguariensis*) Leaf and Beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990.

CLIFFORD, M.N. Review – Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M.N. Review – Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1033-1043, 2000.

CLIFFORD, M.N.; JOHNSTON, K.L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical Scheme for LC-MS Identification of Chlorogenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of Enzyme Kinetics**; Portland Press Ltd, London, 1995.

DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L.C.; MIRANDA L.S. The Content of Individual Caffeoylquinic Acids in Edible Vegetables; **Journal of Food Composition and Analysis** v. 12, p. 289-292, 1999.

DOGAN, S.; TURAN, P.; DOGAN, M. Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymra spicata* L. var. *Spicata*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2379–2385, 2006.

DORAN, P. M.; **Bioprocess Engineering Principles**; Academic Press, 1995.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; WACZUCK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p.193-204, 2002.

FARIA, R.O; MOURE, V.R.; AMAZONAS, M.A.L.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases, **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 287-294, 2007.

FENOLL, L.G.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N.; GARCÍA-SEVILLA, F.; GARCÍA-RUIZ, P.A.; VARÓN, R.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; TUDELA, J. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 1548, p. 1-22. 2001.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G., Phenolic compounds in seven south american *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774-778, 2001.

FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1138–1142, 1995.

GEYSEN S. **Model-Based Design Of Supercritical Oxygen Modified Atmosphere Packages**, (dissertação), Katholieke Universiteit Leuven, Outubro, 2006.

GOETGHEBEUR, M.; KERMASHA, S. Inhibition of polyphenol oxidase by copper-metallothionein from *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 935-940, 1996.

GÓMEZ-LOPEZ V.M.; Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. **Food Chemistry**, v. 77, p. 163–169, 2002.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguayensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in Vivo. **Biochemistry Biophysics**, v. 224, p. 338-344, 1996.

GUI, F.; WU, J.; CHEN, F.; LIAO, X.; HU, X.; ZHANG, Z.; WANG, Z. Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1678–1685, 2007.

HALAOULI, S. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 219-232, 2006.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G.; Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Coffee, Tea, Maté, Methylxanthines and Glyoxal. 51, IARC, Lyons, 1991.

KAWAKAMI, M.; KOBAYASHI A.; Volatile constituents of green mate and roasted mate- **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1275-1279, 1991.

KILMARTIN, P.A.; HSU, C.F. Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, v. 82, p. 501–512, 2003.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed., São Paulo : Editora Sarvier, 1995.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3, 1ª ed, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 594 p, 2001.

LIMA, V.L.A.G.; MELO E. A., Total Phenolic Content in Brazilian Teas; **Braz. J. Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 187-190, 2004.

LIU, X.; GAO, Y.; PENG, X.; YANG, B.; XU, H.; ZHAO, J. Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with high pressure carbon dioxide. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2007.

LOURENÇO, R.S.; MEDRADO, M.J.; FOWLER, J.A.P.; MOSELE, S.H. Influence of substrate on the growing of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Revista Perspectiva**, v. 24, n. 88, p. 81–99, 2000.

MACCARI JR, A. **Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão**, Tese (Doutorado), Campinas 2005.

MARTINEZ, E.; DUVNJAK, Z. Enzymatic Degradation of Chlorogenic Acid using a polyphenoloxidase preparation of the white-rot-fungus *Trametes versicolor* ATCC 42530. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1835–1841, 2006.

MATHEIS, G.; WHITAKER, J.R. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. **Journal of Food Biochemistry**, v. 8, p. 137-162, 1984.

MATOBA, Y.; KUMAGAI, T.; YAMAMOTO, A.; YOSHITSY, H.; SUGIYAMA, M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. **Journal of Biol. Chemistry**, v. 281, p. 8981-8990, 2006.

MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S.P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. **Phytochemistry**, v.55, p. 285-296, 2000.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v. 18, p. 193–215, 1979.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants – recent progress. **Phytochemistry**, v. 26, p. 11-20, 1987.

MAYER A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review; **Phytochemistry**. 2318–2331, 2006.

MCCORD, J.D.; KILARA, A. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Journal Food Science**, v. 48, p. 1479-1483, 1983.

MDLULI K.M. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). **Food Chemistry**, v. 92, p. 311–323, 2005.

MELO G.A. **Purificação da enzima Polifenoloxidase do Cafeeiro, sua relação com resistência a Pragas e o controle da síntese de seu principal substrato, o ácido clorogênico**. Tese (doutorado); Universidade Estadual de campinas; 2005.

MITCHELL, D.A. **Apostila de cinética enzimática**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

MOSER, A. Rate Equations for Enzyme Kinetics. In: H.-J. Rehm and G. Reed (Eds), **Biotechnology**, vol. 2, pp. 199-226, VCH. Weinheim, 1985.

MUNÕZ J.; GARCIA-MOLINA F.; VARON R.; RODRIGUEZ-LOPEZ J.N.; GARCÍA-RUIZ P.A.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; TUDELA J. Kinetic Characterization of the Oxidation of Chlorogenic Acid by Polyphenol Oxidase and Peroxidase. Characteristics of the o-Quinone. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 920-928, 2007.

NEVES V.A.; da SILVA M.A. Polyphenol Oxidase from Yacon Roots (*Smallanthus sonchifolius*); **Journal. Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 2424-2430, 2007.

NEGISHI, O.; NEGISHI, Y.; YAMAGUCHI, F.; SUGAHARA, T. Deodorization with Kuding-cha Containing a Large Amount of Caffeoyl Quinic Acid Derivatives. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 52, p. 5513-5518, 2004.

NÚÑEZ-DELICATO, E.; SOJO, M.M.; GARCÍA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A. Partial Purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemical*, v. 51, p. 2058 – 2063, 2000.

OSUGA, D.; VAN DER SCHAAF, A.; WHITAKER, J.R. **Protein structure-function relationships in foods**. Control of polyphenol oxidase activity using a catalytic mechanism; Eds. Chapman & Hall, 62-88, 1994.

PIERPOINT, W.S. The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochemistry Journal*, v. 98, p. 567-580, 1966.

PRIGENT, S. **Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties**, Ph.D. thesis, Wageningen University, Netherlands, 2005.

RIVELLI, D.P.; SILVA, V.V.; ROPKE, C.D.; MIRANDA, D. V.; ALMEIDA, R.L.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH reduction.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 2, p. 215-222, 2007.

RICHARD-FORGET, F.C.; GAUILLARD, F.A. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase; a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 45, p. 2472-2476, 1997.

ROBERTS, E.A.H. The chlorogenic acids of tea and Maté. *Chemistry and Industry*, p. 985-986, 1956.

RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N.; TUDELA, J.; VARÓN, R.; GARCIA-CARMONA, F.; GARCIA-CÁNOVAS, F. Análisis of a Kinetic Model for Melanin Biosynthesis Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. v. 267, p. 3801-3810, 1992.

SANCHEZ-FERRER, A.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N.; GARCIA-CANOVAS, F.; GARCIA-CARMONA, F. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochemistry Biophysics Acta*, v. 1247, p. 1-11, 1995.

SANTOS, K.A. **Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) em embalagens plásticas**. Dissertação Mestrado – Universidade Federal do Paraná, 2004.

SELLÉS-MARCHART, S.; CASADO-VELA J.; BRU-MARTÍNEZ R. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 446, p. 175–185, 2006.

SEAB Paraná. **Diagnóstico e Alternativas para a Erva-mate *Ilex paraguariensis***. Curitiba, 141 p., 1993.

SCHMALKO, M.E.; MORAWICKI R.O.; RAMALLO, L.A. Simultaneous Determination of Specific Heat Capacity and Thermal Conductivity Using the Finite difference Method; **Journal of Food Engineering**, v.31, p.531-540, 1997.

SOUZA, J.L.M.; M.A.; REISSMANN, C.B.; MACCARI JR A.; WOLF, C.S.; Leaf nutrient contents in *Ilex Paraguariensis* tree considering canopy position and geographical orientation, in Guarapuava PR. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p.49-58, 2008.

STOLL, V. S.; BLANCHARD, J. **Buffers: Principles and Practice**, Methods in Enzymology, v. 182, p. 24-38, 1990.

TANAKA, T.; MORI, H. Prevention of experimental tumorigenesis in colon, liver and oral cavity by dietary chlorogenic and caffeic acids. **Seizième Colloque Scientifique International sur le Café**, ASIC, Paris, p. 79-87, 1995.

TEMPLE S. J.; VAN BOXTEL, A. J. B. Equilibrium moisture of tea. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 74, n. 1, p. 83–89, 1999.

TREVISAN, M.G.; POPPI, R.J. Química Analítica de processos. **Química Nova**, v. 29, p. 1065-1071, 2006.

TRUGO, L.C; MACRAE, R. Chlorogenic Acid Composition of instant coffees. **Analyst**, v. 109, p. 263-266, 1984.

VALDUGA E. **Caracterização Química e Anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* st. hil. e de algumas espécies utilizadas na adulteração do Mate**. Dissertação de Mestrado. UFPR, 1994.

VILCAHUAMAN L. J. M. **Caracterizacion y evaluacion economica del sistema agroflorestal yerba mate en el sur de Brasil: un enfoque financeiro, de optimizacion y de riesgo**, 1999.

ZAMPIER, A.C. **Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação mineral e orgânica, e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis* st hil.)**. Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Paraná; 2001.

ZANOELO, E.F.; Equilibrium Moisture Isotherms for Mate Leaves; **Biosystems Engineering**, v. 92, n. 4, p. 445-452, 2005.

ZANOELO, E.F.; CARDOZO-FILHO, L.; LARA, E.; CARDOZO-JÚNIOR L. Superheated Steam-Drying of mate leaves and effect of drying conditions on the phenol content, **Journal of Food Process Engineering**, v. 29, p. 253-268, 2006.

ZANOELO E.F; di CELSO G.M.; KASKANTZIS G. Drying Kinetics of Mate Leaves in a Packed Bed Dryer, **Biosystems Engineering**, v. 96, n. 4, p. 487-494, 2007.

ZANOELO, E.F.; BENINCÁ, C.; RIBEIRO, E. Thermophysical properties of mateleaves: experimental determination and theoretical effect of moisture content. **Journal of Food Process Engineering** (no prelo), 2009.